

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Nová taxonomie rodu *Listeria*

Denisa Dostálová

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Denisa Dostálová**  
Osobní číslo: **C15403**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Nová taxonomie rodu Listeria**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracujte literární rešerši. Uveďte přehled jednotlivých druhů rodu *Listeria*, Věnujte se novému pohledu na celý rod, naznačte budoucí možné uspořádání rodu *Listeria*. Uveďte příklady molekulárně-biologických metod, kterými jsou nové druhy charakterizovány.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**odborné články z databáze WoS, které nejsou starší 10-ti let.**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2018

.....

Denisa Dostálová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji mé vedoucí bakalářské práce Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a dobré rady při zpracování této bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se věnuje charakteristice rodu *Listeria*. V práci je uvedené rozdělení rodu *Listeria* a jak se postupně vyvíjela skupina *Listeria sensu lato*. Poslední část práce se zabývá metodami, díky kterým byla zjištěna nová taxonomie rozdělení rodu *Listeria*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Listeria sensu stricto*, *Listeria sensu lato*, virulence, metodika

## **TITLE**

New taxonomy of the genus *Listeria*.

## **ANNOTATION**

The bachelor work deals with the characterisation of the genus *Listeria*. It is introduced its the distribution of the genus *Listeria* and how the group *Listeria sensu lato* has gradually developed. The last part od the thesis deals with the methods, which reveal a new taxonomy of distribution of the genus *Listeria*.

## **KEYWORDS**

*Listeria sensu stricto*, *Listeria sensu lato*, virulence, methodology

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>1 HISTORIE</b> .....	<b>13</b>
<b>2 ROD <i>LISTERIA</i></b> .....	<b>14</b>
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
2.2 <i>Listeria ivanovii</i> .....	16
2.3 <i>Listeria grayi</i> .....	17
<b>3 ROZDĚLENÍ RODU <i>LISTERIA</i></b> .....	<b>19</b>
3.1 <i>Listeria sensu stricto</i> .....	20
3.1.1 Fenotypové vlastnosti <i>Listeria sensu stricto</i> .....	20
3.1.2 Fenotypové rozlišení <i>Listeria sensu stricto</i> .....	21
3.1.3 Genotypové vlastnosti <i>Listeria sensu stricto</i> .....	21
3.2 <i>Listeria sensu lato</i> .....	22
3.2.1 Fenotypové vlastnosti <i>Listeria sensu lato</i> .....	23
3.2.2 Genotypové vlastnosti <i>Listeria sensu lato</i> .....	24
<b>4 PATOGENITA</b> .....	<b>26</b>
4.1 Virulence .....	26
4.1.1 Změny v patogenitě.....	28
4.2 Biofilm .....	29
4.2.1 Jednotlivé fáze tvorby biofilmu .....	30
<b>5 VÝSKYT</b> .....	<b>31</b>
5.1 Nálezy v České republice.....	32
5.2 Nálezy v Polsku.....	33
5.3 Nálezy na Slovensku .....	33
5.4 Nálezy v Německu .....	34
5.5 Nálezy v Rakousku .....	34

<b>6</b>	<b>NORMY</b> .....	<b>36</b>
6.1	Norma EN ISO 11290 (560093) .....	36
6.1.1	Zrušená norma: Norma ČSN EN ISO 11290 (560093) .....	36
6.1.2	Nové vydání: ČSN EN ISO 11290 (560093).....	36
<b>7</b>	<b>METODY STANOVENÍ</b> .....	<b>38</b>
7.1	Izolace .....	38
7.1.1	PALCAM agar .....	39
7.1.2	ALOA agar.....	40
7.1.3	OXFORD agar .....	41
7.2	Vyšetření sérotypu .....	42
7.3	Chromogenní média .....	42
7.4	Imunochemické metody .....	43
7.4.1	ELISA .....	43
7.4.2	Imunochromatografické testy .....	44
7.5	Molekulárně biologické metody .....	44
7.5.1	PCR .....	44
7.5.2	Real-time PCR .....	45
7.5.3	Metoda RFLP .....	46
7.5.4	Genotypizační metody .....	48
7.5.5	Pulzní gelová elektroforéza - PFGE.....	49
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>CITOVANÁ LITERATURA</b> .....	<b>53</b>



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>OBRÁZEK 1-</b> PATOGENEZE ONEMOCNĚNÍ – UPRAVENO PODLE (REINPRODUCT, 2017).....	14
<b>OBRÁZEK 2–</b> <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> (DR GAUGLER G., 2018).....	16
<b>OBRÁZEK 3 -</b> FYLOGENETICKÝ VÝVOJ RODU <i>LISTERIA</i> (WELLER D., 2015) .....	20
<b>OBRÁZEK 4-</b> INTRACELULÁRNÍ ŽIVOTNÍ CYKLUS LISTÉRIE (PORTNOY D. A., 2002) .....	28
<b>OBRÁZEK 5-</b> PALCAM AGAR (E & O LABORATORIES LTD , 2018) .....	40
<b>OBRÁZEK 6-</b> ALOA AGAR (DIAMEDICA, 2008) .....	41
<b>OBRÁZEK 7-</b> <i>LISTERIA</i> (OXFORD) AGAR (E & O LABORATORIES LTD , 2018) .....	42
<b>TABULKA 1 –</b> MÍRA ÚMRTNOSTI SOUVISEJÍCÍ S <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> (BRYCHTA J., 2015).....	31
<b>TABULKA 2 –</b> PŮVOD TESTOVANÝCH KMENŮ S UVEDENÍM JEJICH SÉROTYPU A RFLP PROFILU (GELBÍČOVÁ T., 2011).....	48

## **SEZNAM ZKRATEK**

ActA – Actin assembly-inducing protein (Aktin indukující protein)

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists (Sdružení oficiálních zemědělských chemiků)

CFU – Colony forming unit (Jednotky tvořící kolonie)

CRP / FNR – cAMP receptor protein / fumarate and nitrate reduction regulatory protein (cAMP receptor protein / fumarát a dusičnan regulační protein)

DNA – Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleová kyselina)

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (enzymová imunoanalýza)

ETX – Epsilon-toxin

FIGE - Field-inversion gel electrophoresis (Inverzní gelová elektroforéza)

FlaA – Flagellin A (Flagellin)

FMN – Flavin mononucleotide (Flavinmononukleotid)

Hly – Listeriolysin O

Hpt – Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hypoxanthin fosforibosyltransferáza)

InlA – Internalin-A

InlB – Internalin-B

InlC – Internalin- C

InlJ – Internalin- J

ISO – The international organization for standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)

LFIA – Lateral Flow Immuno Assay (Imunochromatografické testy)

LIPI-1 - Listeria pathogenicity island 1 (Patogenní ostrov listérii)

LLO- Listeriolysin O

MogR – Motility gene repressor (Pohybový genový represor)

Mpl – Metalloendopeptidase (Prekurzor metaloproteinázy)

MTX2 – Mosquitocidal toxin 2 (Komáří toxin 2)

PAI – Pathogenicity island (Ostrov patogenity)

PCR- Polymerase chain reaction (polymerasová řetězová reakce)

PFGE - Pulsed-field Gel Electrophoresis (Pulzní gelová elektroforéza)

PI-PLC - Fosfatidylinositol-specifická fosfolipáza C

PlcA – Phosphatidylinositol phospholipase C (Fosfatidylinositol fosfolipáza C)

PlcB – Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (Fosfatidylcholin fosfolipáza C)

PLC – Phosphatidylinositol phospholipase C (Fosfatidylinositol fosfolipáza C)

PMSC – Premature stop codon (Předčasný stop kodon)

PrfA – Listeriolysin positive regulatory protein (Listeriolysin pozitivní regulační faktor)

RibAB – Riboflavin AB

RibD – Riboflavin D

RibE – Riboflavin E

RibH – Riboflavin H

Seq- Sequence control (Kontrola sekvencí)

TSA - Tryptone soya agar (Tryptonový sójový agar)

## ÚVOD

Tato bakalářská práce pojednává o rodu *Listeria*, který se poprvé objevil ve dvacátých letech minulého století v Cambridge. Od této doby bylo nalezeno mnoho dalších druhů listérií, které se stále zkoumají.

Jako první listérie byla objevena *Listeria monocytogenes*, která se skládá z různých sérotypů. Nejdůležitějším a nejzastoupenějším sérotypem v České republice a na Zemi vůbec, je sérotyp 1/2a, obsažený v mnoha kontaminovaných potravinách. Další kombinace sérotypů u tohoto druhu jsou nalézány postupně a jejich výzkumy zasahují až do současnosti.

Rod *Listeria* byl rozdělen na dvě základní skupiny. Skupiny se skládají z druhů s podobným fenotypem a hlavně genotypem.

První skupina se označuje jako *Listeria sensu stricto*. Je to nejstarší skupina tohoto rodu a patří sem dvě jediné patogenní listérie. První z nich je *Listeria monocytogenes*, která je patogenní jak pro člověka, tak pro zvířata. Druhá, *Listeria ivanovii*, je nebezpečná hlavně pro zvířata, ale objevila se i u lidí.

Druhá skupina je označovaná jako *Listeria sensu lato* a je novější skupinou tohoto rodu, ve které jsou stále plně neprobádané druhy. Nemůžeme proto jednoznačně posoudit, zda jediné dvě patogenní listérie z celého rodu náleží pouze do prvotní skupiny *sensu stricto*. U druhé skupiny se stále zjišťuje patogenita listérií, která není zcela objasněna.

Celkový zájem o listérie v poslední době vysoce vzrostl, jelikož se objevují rozsáhlé epidemie, které zasahují stále více obyvatel na mnoha místech na Zemi. Příčinou jsou listeriózy způsobené právě *Listeria monocytogenes*. V mé bakalářské práci jsem se zaměřila na incidenci v České republice a státech, které nám jsou nejbližší.

Do současné doby nejsou stále nalezené všechny druhy listérií.

# 1 HISTORIE

První zkoumání listérií proběhlo v roce 1926, přičemž tento výzkum vedl pan Everitt George Dunne Murray s jeho kolegy v Cambridge a James Hunter Harvey Pirie v Johannesburgu. Zkoumání vedlo poprvé k detailnímu popisu listeriózy, která je zapříčiněna *Listeria monocytogenes* u lidí, nebo *Listeria ivanovii* u zvířat. V obou případech se testy prováděly na malých zvířatech, jako jsou králíci a myši. Výzkumy vedly nejen k popisu nemoci zvané listerióza, ale také se prováděla izolace bakterií a vše vedlo až k novému pojmenování druhů listérií.

K počátečnímu kroku zkoumání došlo díky náhlé smrti mladých králíků v chovatelské stanici na Univerzitě v Cambridge v roce 1924 spolu s dalšími stejnými případy, které se objevovaly v následujících patnácti měsících. U těchto králíků byla izolována drobná gram-pozitivní tyčinka nazvaná *Bacterium monocytogenes*. O tři roky později se nemoc objevila i u lidí a byla popsána u pacientů s angínou a uzlinovým syndromem v hemokultuře a také u pacientů s meningeálními příznaky v mozkomíšním moku.

V roce 1927 pan J. H. H. Pirie oznámil, že přenos listeriózy je spojen s konzumací kontaminovaných potravin. Později byla tato zkoumání zapomenuta kvůli dočasnému vymizení listeriózy a tato nemoc začala být považována za méně časté onemocnění.

V roce 1939 odmítla komise Mezinárodního výboru pro systematickou bakteriologii název *Listerella*, neboť byl už použit již v roce 1906 pro *Mycetozoa* neboli Hlenky, a také v roce 1933 pro *Foraminifera* neboli Dírkonožce. Proto v dalším roce, tedy roku 1940, navrhl pan Pirie jméno *Listeria*, které se ihned uchytilo. Tato bakterie byla později pojmenována na počest anglického chirurga Josepha Listera. Jako první listérie vůbec byla pojmenována *Listeria monocytogenes*. (JANČOVÁ J., 2007)

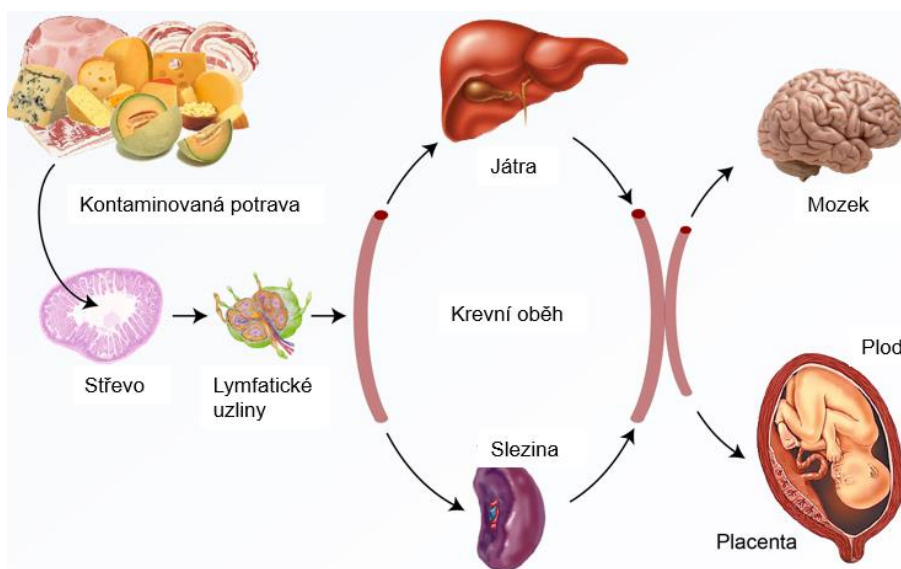
Vše se otočilo v 80. letech, kdy opět došlo k dramatickým změnám. Listérie se tentokrát netýkala pouze mikrobiologů, ale týkala se celé veřejnosti, mezi kterou se v roce 1981 tato nemoc rozšířila. Díky tomuto rozšíření se začala lépe chápat epidemiologie onemocnění, samotná nemoc i fyziologie organismu, avšak nejdůležitější je, že se začaly provádět účinné metody a kontroly organismů v potravinovém řetězci, neboť bylo zjištěno, že tato nemoc pochází právě z různých druhů potravin. (KYRIAKIDES A., 1998) (RYSER T. E., 1999)

## 2 ROD *LISTERIA*

Rod *Listeria* náleží do rodiny *Listeriaceae*, což je kmen, který se skládá z gram-pozitivních malých bakterií. U tohoto rodu najdeme ve velmi malé míře guanin a cystein v molekule DNA. Obsahuje pouhých 36–42 % z celé molekuly. Listérie mají tvar tyčinek a jsou velice rozšířeným kmenem. Patří mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy, což znamená, že žijí za přítomnosti vzdušného kyslíku, ale mohou žít i bez něho. (NATALIE C. KLEIN, 1991) (SUCHODOLSKI J., 2013)

Některé druhy listérií jsou pohyblivé. Pohyblivost je způsobena bičíky, které mají pouze *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* a *Listeria grayi*. Listérie se dělí na patogenní a nepatogenní mikroorganismy. Patogenní druhy jsou takové, které mohou zapříčinit onemocnění hostitele, což může být člověk i zvíře. Tento mikroorganismus jako takový netvoří spory, ale biofilmy. (SCHARDT J., 2017)

V současnosti tento rod obsahuje 18 uznaných druhů. Jako nejdůležitější a nejznámější jsou patogenní listérie. Mezi patogenní listérie patří *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii*. Ostatní druhy jsou nepatogenní nebo se stále zkoumají. Listérie se celkově objevují jak u lidí, tak u zvířat. Největší nálezy listérií jsou izolovány z kontaminované potravy, z níž vznikají nejčastější listeriózní onemocnění zapříčiňující listérie. (ORSI R. H., 2016)



**Obrázek 1-** Patogeneze onemocnění – Upraveno podle (REINPRODUCT, 2017)

## 2.1 *Listeria monocytogenes*

Jak již bylo zmíněno, tato listérie byla jako první objevena panem Murray v Cambridge. Nejdůležitější informací je, že spolu s *Listeria ivanovii* jsou považovány za patogenní organismy.

*Listeria monocytogenes* je nejvíce izolována z půdy, různých vegetací, vody a výkalů. Jedná se také o bakterii, která má tzv. kontrastní způsob života, neboť se jedná o saprofyta. Saprofyt je taková bakterie, která využívá hostitele jako vhodné prostředí a zdroj výživy, přičemž hostitel není nijak poškozován, ale zároveň může žít i mimo hostitele, na různých potravinářských strojích. (SCHARDT J., 2017)

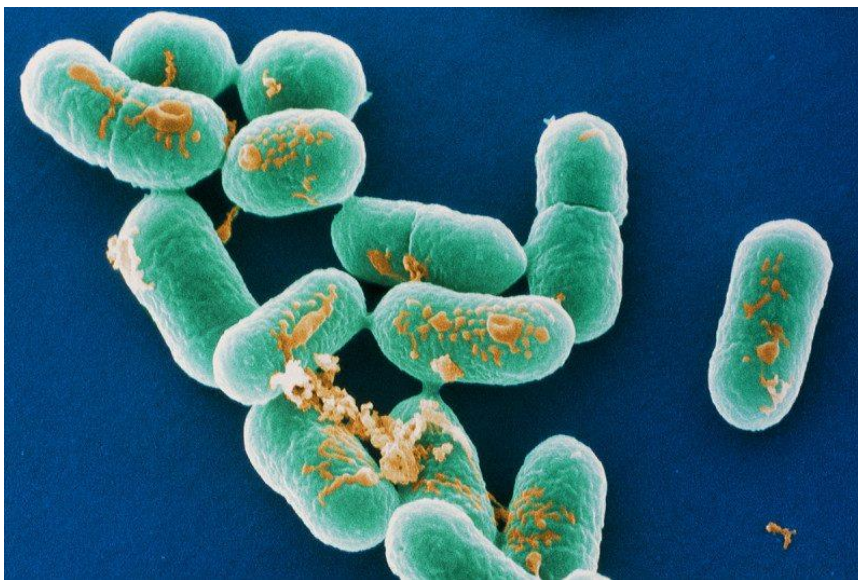
*Listeria monocytogenes* je fakultativně anaerobní, nesporetvorná a gram-pozitivní tyčinka. Velikostí se neliší od ostatních malých mikroorganismů, mají délku 1 – 2  $\mu\text{m}$ . Pod mikroskopem tento druh nacházíme jednotlivě, ve dvojicích, nebo také může tvořit řetízkovité útvary.

Na krevním agaru vytváří zónu  $\beta$ -hemolýzy.  $\beta$ -hemolýza se vyznačuje zónou hemolýzy, která se nachází pod koloniemi. *Listeria monocytogenes* je zařazena mezi hemolytické druhy, které obsahují homologii hlavního genu virulence, což je klastér *prfA*. Jako jedna z mála je podporována schopností se přizpůsobit slaným, kyselým a vysokoteplotním prostředím. Toleruje širokou škálu pH, jejich rozhraní je od 4,5 do 9,0. Mohou žít v rozsáhlé teplotní šíři, myšleno tím bylo od 4 °C do 45 °C. Nevadí jim ani vysoká koncentrace soli, která může mít i 10 % NaCl. Jako jedna z mála listérií tvoří biofilmy, tudíž se může objevovat na kontaminovaném místě i několik let. (RAMASWAMY V., 2007) (NATALIE C. KLEIN, 1991)

Nejdůležitějším znakem této bakterie je, že se rozděluje do základních 12 sérotypů neboli též nazývaných sérovarů. Patří sem sérotyp 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e a 7. Rozdělení je na základě reakcí pomocí známých antigenů O neboli též somatických antigenů a také H antigenů neboli bičíkových antigenů, které mají již zmíněná specifická antiséra. Listeriόza u člověka je z 98 % zapříčiněna pouze třemi sérotypy, do kterých náleží sérotyp 1/2a, 1/2b a 4b. Sérotypy 4a a 4c se uplatňují sporadicky. Sérotyp 4b byl zjištěn u velkých hromadných epidemií a sérotypy 1/2a, 1/2b byly prokázány u menších epidemií, nebo jednotlivých onemocnění. (BRYCHTA J., 2011)

*Listeria monocytogenes* se objevuje u lidí prostřednictvím potravin. Nejčastěji ji nalézáme v potravinách, jako jsou mléčné výrobky a maso. Nejvíce se objevuje v tavených sýrech, měkkých sýrech, v uzených rybách, mořských plodech a mase.

Tato listérie je velice nebezpečná pro těhotné, kojící ženy a pro lidský plod. Obecně platí, že u imunokompetentních jedinců, což jsou lidé, kteří mají v pořádku imunitní systém, je pozorováno neinvazivní gastrointestinální onemocnění. Zatímco u imunokompromitovaných neboli imunodeficitních jedinců nebo u těhotných žen a novorozenců, vede infekce k invazivní listerióze, kdy může dojít k septikémii, meningitidě a samovolným potratům. Imunodeficitní pacienti jsou osoby trpící onemocněním AIDS, pacienti trpící jakoukoliv rakovinou, onemocněním ledvin, diabetem nebo lidé, kteří užívají glukokortikoidy nebo antacida, což používají pacienti, kteří mají problémy s hypoaciditou žaludečních šťáv a starší osoby. U těhotných žen hrozí postižení plodu. (ALLENA K. J., 2016) (ORSI R. H., 2016) (DREVETS A. D., 2008)



**Obrázek 2**– *Listeria monocytogenes* (DR GAUGLER G., 2018)

## 2.2 *Listeria ivanovii*

*Listeria ivanovii* je malá listérie o velikosti 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$ . Tvoří šedavě modré kolonie s hemolýzou na krevním agaru, tudíž se zařazuje taktéž mezi typické hemolytické druhy rodu listérie. Její morfologie se neliší tolik od *Listeria monocytogenes*, taktéž mají krátký tyčovitý tvar a jsou pohyblivé. *Listeria ivanovii* jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní.



Patogenita bakterií souvisí s přítomností intaktních virulentních genů, které usnadňují přímou interakci mezi bakterií a hostitelskými buňkami podporujícími kolonizaci, vstup a úmrtí hostitelských buněk. U *Listeria ivanovii* najdeme navíc specifický genetický ostrov s virulentními faktory, které se nazývají LIPI-2. LIPI-2 obsahují více interninů a také hemolytický gen sfingomyelinázu. Celková fylogenetická analýza *Listeria sensu stricto* naznačuje, že nepatogenní druhy se vyvinuly z patogenního předka diferenciací ztrátou patogenních faktorů. (CHAIRA M., 2015)

*Listeria ivanovii* byla pojmenována podle bulharského mikrobiologa Ivana Ivanova, který poprvé tuto listérii izoloval z ovčí, u kterých se opakovaně objevovaly samovolné potraty. Stejně jako *Listeria monocytogenes*, také *Listeria ivanovii* napadá hostitelské buňky, kde se listérie replikují v cytosolu a po úniku z fagozomu se šíří z buňky na buňku, díky polymerizaci aktinu.

Napadají zejména již zmíněné ovce a dobytek, u kterých způsobují septikemické onemocnění s enteritidou. Objevují se i výjimky, jako v roce 2007, kdy byla izolována z pacienta, přesněji z 55-letého muže. Případy, kdy se objeví *Listeria ivanovii* u lidí, jsou extrémně vzácné a jsou taktéž spojeny s imunodeficiencí. Proto se tato listérie objevila také u pacientů, kteří trpěli nemocí AIDS nebo u pacientů, kteří měli metastazující karcinom. Nejčastěji to byli pacienti s věkem nad 60 let.

*Listeria ivanovii* byla izolována ze stolice, což naznačuje, že došlo k infekci prostřednictvím kontaminovaných potravin. Tato izolace listérie ze stolice prokázala, že se *Listeria ivanovii* dostává přes lumen střev, kde způsobuje gastroenteritidu a dále se šíří do krevního oběhu. U 55-letého muže nebyl sehnán vzorek pro průkaz, že právě *Listeria ivanovii* byla součástí řemeslného kozího sýra, vyrobeného ze syrového mléka, který jistý muž konzumoval pár dní před tím, než se u něho infekce projevila. Přestože nebyl původ této listérie formálně prokázán u lidí, tak u přežvýkavců ano, ve spojení s konzumací zkažené siláže nebo zkaženého sena. (GUILLET CH., 2010) (BUCHRIESER C, 2011)

### **2.3 *Listeria grayi***

*Listeria grayi* patří mezi listérie, u které se neprojevuje hemolýza na krevním agaru, a taktéž tato listérie náleží mezi druhy, které nejsou virulentní. Byla objevena roku 1966 panem Murray a pojmenována po panu M. L. Gray. Spolu s *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* patří mezi listérie, které jsou pohyblivé.

Dříve bylo pojednáváno o jejím formálním vyloučení, jako člena rodu *Listeria* spp., jelikož se ukázalo, že je velice odlišná od ostatních druhů. Bylo tedy navrženo, že bude zastupovat nový rod *Murraya*, který náleží do skupiny *Listeria sensu lato*, jako nový druh listérie.

Tato listérie se v roce 1974 rozdělila na *Listeria grayi* subsp. *grayi* a *Listeria grayi* subsp. *murrayi*. *Listeria grayi* subsp. *murrayi* byla pojmenována podle spoluzakladatele *Listeria monocytogenes* panem Murray. V uplynulých letech se prokázalo, že *Listeria grayi* je poddruh *Listeria murrayi*. (SAUDERS B. D., 2012)

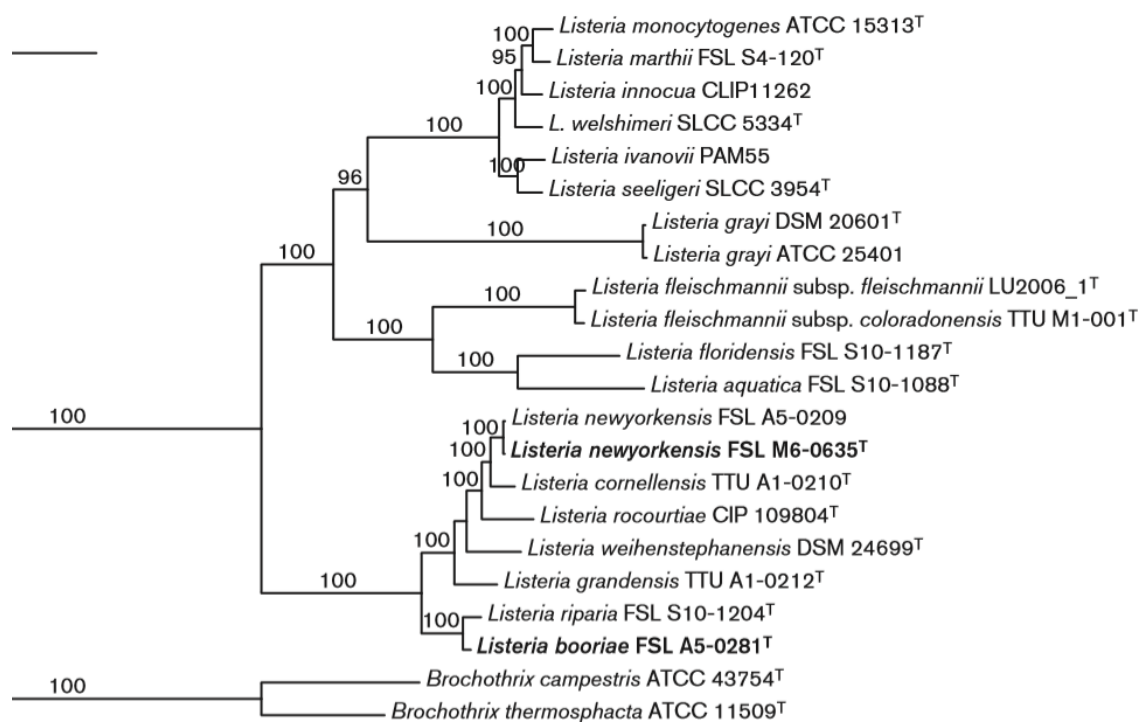
Rozdíl mezi *Listeria grayi* subsp. *grayi* a *Listeria grayi* subsp. *murrayi* je ten, že první z nich neredukuje dusičnany a *Listeria grayi* subsp. *murrayi* dusičnany redukuje. (HITCHINS Anthony D., 2017)

### 3 ROZDĚLENÍ RODU *LISTERIA*

Rod *Listeria* se v současné době skládá ze 18 druhů, včetně 10 druhů *Listeria*, které jsou nově popsány od roku 2009. Samostatný genotyp s fenotypem, jenž hraje hlavní roli v rozdělení a také definuje odlišnou skupinu šesti druhů, které se společným názvem nazývají *Listeria sensu stricto*. *Listeria sensu stricto* mají společné fenotypové vlastnosti na rozdíl od druhů, které se nazývají *Listeria sensu lato*. *Listeria sensu lato* je novou, ale ne plně prozkoumanou skupinou. Hybridizace DNA-DNA a sekvenční výsledky 16S rRNA ukázaly rozdělení do těchto dvou genomicky příbuzných skupin.

Nových 12 druhů, které se společným názvem nazývají *Listeria sensu lato*, představují tři odlišné monofylitické skupiny. Monofylitické skupiny pocházejí ze společného evolučního předka nebo rodové skupiny, ze kterých vznikly nové druhy. Skupiny organismů, do kterých patří náležitý evoluční předek a z něho nově vytvořené druhy, se nazývají klad. Analýzy naznačují, že získávání genetického materiálu pro nové druhy *Listeria sensu stricto* je prostřednictvím genové duplikace, divergence a letálního přenosu genu. U letálního přenosu genu bylo zjištěno, že přenos genu byl i z jiného rodu, než-li byl rod *Listeria* neboli z organismu velice podobného, jako je *Bacillus cereus*, ale také ze společného předka *Listeria grayi*, tedy ze skupiny *Listeria sensu stricto*. Všechny druhy byly podrobeny celogenomovému sekvenování a fylogenetické analýze sady zřetězených jadrových genů. (CHAIRA M., 2015) (SCALLAN E., 2011)

Do skupiny *Listeria sensu lato* patří rod *Murraya*, který se skládá z *Listeria grayi* subs. *grayi* a *Listeria grayi* subs. *murrayi*, které byly izolovány z vegetace a představují sesterský klad skupiny *Listeria sensu stricto*. Rod *Mesolisteria* se skládá z *Listeria fleischmanni* subs. *fleischmanni*, *Listeria fleischmanni* subs. *coloradensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica* a nově zařazena *Listeria constaricensis* tvoří sesterský klad se skupinou *Listeria sensu stricto* a s *Listeria grayi*. Poslední rod ze skupiny *sensu lato*, je rod *Paenilisteria*, do které patří *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* a *Listeria booriae*. Ty představují základní bázi v rodu. (Obr.: 1) Tyto tři navrhované rody neobsahují patogeny, jsou nepohyblivé, tedy kromě *Listeria grayi*, a jsou schopné redukovat dusičnany. Jediný, kdo neumí redukovat dusičnany, je *Listeria floridensis*. (WELLER D., 2015)



**Obrázek 3 -** *Fylogenetický vývoj rodu Listeria (WELLER D., 2015)*

### 3.1 *Listeria sensu stricto*

Historicky se genomová i molekulární charakteristika rodu *Listeria* soustředila na důležitou lidskou tradici *Listeria monocytogenes* a na malý počet příbuzných druhů, které se nazývají *Listeria sensu stricto*. Tento oddíl zahrnuje *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri* a *Listeria innocua*, všechny tyto druhy byly popsány již před rokem 1985, avšak nově objevenou listérií byla *Listeria marthii*, která byla poprvé popsána v roce 2010. Všechny tyto druhy byly pojmenovány podle vědců, kteří hráli důležitou roli při studiích listérií, kromě *Listeria monocytogenes* a *Listeria innocua*. Druhy *Listeria sensu stricto* byly izolovány ze stolice nebo z gastrointestinálního traktu zvířat, ale také z potravin živočišného původu, což značí specifickou interakci těchto druhů s hostitelem.

#### 3.1.1 Fenotypové vlastnosti *Listeria sensu stricto*

*Listeria sensu stricto* mají mnoho fenotypových vlastností, díky tomuto znaku to dělá z této skupiny snadno rozpoznatelné členy rodu *Listeria*.

Druhy *Listeria sensu stricto* mají mnoho charakteristik, do nichž patří schopnost růstu mikroorganismů ve 4 °C, pohybují se při 30 °C, mají pozitivní katalázovou reakci. Důležitou schopností je redukce dusičnanů na dusitany a v neposlední řadě mají pozitivní Voges-

Proskauerova reakci, což je reakce pro průkaz produkce acetoinu z fermentace glukózy cestou butandionu. Všechny druhy *Listeria sensu stricto* jsou schopné fermentovat D-arabitol,  $\alpha$ -methyl D-glukozu, celobiózu, D-fruktosu, D-mannosu, N-acetylglukosamin, maltózu a laktózu. (BERTSCH D., 2013)

### 3.1.2 Fenotypové rozlišení *Listeria sensu stricto*

Dva druhy, které jsou považovány za patogenní, jakožto *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* spolu s *Listeria innocua*, vykazují aktivitu fosfatidylinozitol-specifickou fosfolipázu C neboli PI-PLC. Fosfatidylinozitol je fosfolipid s navázaným cyklickým alkoholem inositolu. Fosfolipáza C rozkládá fosfatidylinozitol na inositoltrifosfát a 1,2- diacylglycerol.

*Listeria ivanovii* může být odlišná od všech druhů v *Listeria sensu stricto*, kvůli své schopnosti fermentace neboli kvašení D-ribózy.

*Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* a *Listeria seeligeri* i s některými druhy *Listeria innocua* vykazují hemolytické schopnosti. Hemolýza je zapříčiněna poškozením cytoplazmatické membrány červených krvinek, na kterém se podílí virulentní gen PrfA.

*Listeria welshimeri* se identifikuje svojí schopností fermentovat D-xylózu, spolu s *Listeria ivanovii* a *Listeria seeligeri*, ale jako jediná *Listeria welshimeri* fermentuje zároveň i D-tagatózu. *Listeria seeligeri* se odlišuje od *Listeria ivanovii* a *Listeria welshimeri* tím, že jako jediná již nefermentuje D-ribózu a D-tagózu.

*Listeria marthii* jako jediný druh *Listeria sensu stricto*, který nedokáže fermentovat sacharózu, což je důležitá charakteristika, která může být použita k odlišení od ostatních druhů tohoto kmene.

*Listeria innocua* je typická tím, že nedokáže tvořit hemolýzu a fermentovat D-xylózu. Zároveň je obtížné ji odlišit od *Listeria monocytogenes* a *Listeria seeligeri* na základě standardních biochemických testů, jelikož dokáže zároveň fermentovat glycerol. (WELLER D., 2015)

### 3.1.3 Genotypové vlastnosti *Listeria sensu stricto*

Genomy u druhu *Listeria sensu stricto* se skládají z mnoha vlastností. Obsah cytosinu a guaninu se odhaduje na 34,6 do 41,6 % a velikosti genomů se pohybují od 2,8 do 3,2 Mb. Supragenomy, což jsou geny, které mohou mít rozdíly v obsahu genu mezi úzce příbuznými kmeny neboli to je spojení všech genových sad kmenů, které se používají pro nejbližší popis

druhu, je tvořen součtem jádra a dispenzovatelných genomů. Dispenzovatelné geny se dají rozdělit na geny, které jsou přítomné ve dvou nebo více kmenech a geny jedinečné pro každý kmen. (MEDINI D., 2005)

Supragenomy se u *Listeria sensu stricto* odhadují na 6500 genů, z nichž se 17 % genů podílí na metabolismu nukleobázy, nukleotidu, nukleosidu a nukleové kyseliny, 14 % z nich se podílí na buněčném makromolekulárním metabolismu a 10 % z nich se podílí na procesu metabolismu bílkovin. Důležitým znakem *Listeria sensu stricto* je vysoký počet internalinů, které jsou uloženy na povrchu mikroorganismu. (DEN BAKKER H. C., 2010)

Bylo nalezeno místo o velikosti 53 kb, které zahrnuje geny, jenž se podílejí na metabolismu ethanolaminu, kobalaminu a propan-2-diolu u všech druhů *Listeria sensu stricto*. V tomto místě se objevuje 82 genů, které se podílejí na biosyntetickém procesu kobalaminu neboli vitamínu B12, s využitím ethanolaminu a propan-2-diolu pro vyvolání onemocnění u obratlovců, což způsobuje hlavně *Listeria monocytogenes* a *Salmonella*. Kvůli tomuto jevu, že se tento ostrůvek genů objevuje pouze u *Listeria sensu stricto* a neobjevuje se i u *Listeria sensu lato*, začaly spekulace o tom, že celý ostrov byl přenesen na předchůdce *Listeria sensu stricto* ze *Salmonella* jako bakterie nebo jiných gram-pozitivních bakterií. (CHIARA M., 2015)

### **3.2 *Listeria sensu lato***

Všechny druhy, jenž patří do tohoto kmene, jsou nepatogenní nebo stále nebyly prozkoumány. První předchůdce *Listeria sensu lato* byla popsána v roce 1966, kdy tímto předchůdcem byla *Listeria grayi*.

*Listeria grayi* je nejvíce příbuzná druhům *Listeria sensu stricto*. Je to kvůli tomu, že je jako jediná pohyblivá. Do tohoto druhu spadají také zástupci *Listeria fleischmanni*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria neworkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, *Listeria booriae* a nejnovější listérií je *Listeria constaricensis* spp. nov. Tyto kmeny byly izolovány z povrchů potravin, anebo byly izolovány ze životního prostředí. Identifikace izolátů *Listeria sensu lato* umožnila lepší pochopení vývoje vlastností a virulence listerií obecně. Umožnila také i praktické důsledky, neboť detekce druhů *Listeria* je čím dál více často používanou metodou pro potravinářský průmysl, jako ukazatel zjišťování podmínek, které umožňují přítomnost, růst a odolnost nejběžnější listérie, jakou je *Listeria monocytogenes*. (SCHARDT J., 2017)

Druhy *Listeria sensu lato* byly popsány teprve v nedávné době, s výjimkou druhu *Listeria grayi*, a jejich objevení nebylo do současnosti značně objasněno. Nicméně dva druhy

*Listeria newyorkensis* a *Listeria fleischmannii* byly již identifikovány jak v Severní Americe, tak v Evropě, což značí, že jejich výskyt může být velice široký. (CHAIRA M., 2015)

*Listeria newyorkensis* byla poprvé izolována ze syrového mléka v Itálii a ze zařízení na zpracování mořských plodů v severovýchodním USA. Zatímco *Listeria fleischmannii* byla poprvé izolována ze sýrů v Itálii a ve Švýcarsku a poté v jednom sýru z ranče v Coloradu.

Mezi druhy, které se vyskytovaly pouze v Evropě nebo v USA, byla například *Listeria rocourtiae*. Tato listérie byla izolována v Rakousku ze salátu. *Listeria weihenstephanensis* byla izolována z německého rybníka. Listérie, které byly izolovány pouze v USA, jsou *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica* a *Listeria riparia*, kdy všechny tři druhy byly izolovány z vodních zdrojů.

Nejvíce rozšířeným druhem je *Listeria grayi*, která, jak již je zmíněno v odstavcích výše, byla objevena jako první z tohoto kmene. Tato listérie byla izolována již z několika kontinentů, včetně Evropy, Asie, Afriky, Severní Ameriky a Jižní Ameriky, kdy se izolovala ze sladkovodních ryb a z jatek. (ORSI R. H., 2016)

Mezi nejnovější druh patří *Listeria constaricensis*. Tato bakterie byla izolována z kanalizačního systému v Kostarice a patří k listérii, která není zcela probádána. Všechna kritéria splňovala pro rod *Listeria*, ale nemohla být přidělena k žádnému již známému druhu. Fylogenetická analýza založená na genu 16S rRNA odhalila nejvyšší sekvenční podobnost s kmenem typu *Listeria floridensis* s 98,7 %. Fylogenetická analýza založená na jádrovém genomu přidávala nový klad k *Listeria fleishmannii*, *Listeria floridensis* a *Listeria aquatica*. V posledním kroku analýzy celé genomové sekvence vědci zjistili, že tento izolát náleží do zcela nového druhu. (NÚÑEZ-MONTERO K., 2018)

### **3.2.1 Fenotypové vlastnosti *Listeria sensu lato***

Všechny tyto druhy jsou kataláza pozitivní, žádný z nich netvoří spory ani kapsle a jsou tyčového tvaru, stejně jako *Listeria sensu stricto*. Od *Listeria sensu stricto* je odlišujeme pomocí několika fenotypových vlastností.

Společným znakem všech tří skupin *Listeria sensu stricto* je nepohyblivost při teplotě od 4 do 37 °C. Jedinou výjimkou je bakterie z tohoto rodu *Listeria grayi*, která při těchto stupních vykazuje známky pohyblivosti. Tyto nálezy jsou v souladu s genomickými studiemi, které uvádějí nepřítomnost flagelárních genů, kromě již zmíněné *Listeria grayi*.

Žádná *Listeria sensu lato* netvoří hemolýzu a nevykazuje aktivitu fosfatidylinozitol-specifické fosfolipázy C neboli PI-PLC. Všechny druhy, kromě *Listeria grayi*, dokáží fermentovat D-xylosu a D-glukózu, ale nedokáží fermentovat glukózu-1-fosfát ani inulin. Pokud se provádí Voges-Proskauerův test, mají všechny druhy *Listeria sensu lato* negativní reakci, až na *Listeria grayi*, která je pozitivní a *Listeria aquatica*, z rodu *Mesolisteria*, která má taktéž pozitivní reakci. Jestliže vykazují pozitivní reakci u tohoto testu, značí to schopnost produkce acetoinu z fermentace glukózy cestou butandiolu.

Zajímavostí je, že druhy *Listeria fleischmannii*, *Listeria aquatica* a *Listeria floridensis* ztratily schopnost růstu v kapalných médiích při 4 °C. Díky této charakteristice jsou tyto druhy odlišné od ostatních členů rodu *Listeria*. (DEN BAKKER H. C., 2014) (WELLER D., 2015)

### 3.2.2 Genotypové vlastnosti *Listeria sensu lato*

Údaje o genomové sekvenci všech druhů *Listeria sensu lato* jsou jedinečnou příležitostí pro lepší charakteristiku těchto druhů a zároveň umožnily nové poznatky ve vývoji virulence v celém rodu *Listeria*. Obsah cytosinu a guaninu se pohybuje od 38,3 %, kde se tento obsah objevuje u *Listeria fleschmanni*. *Listeria newyorkensis* a *Listeria booriae* mají až do 45,2 %. Na základě fenotypových údajů a genomové analýzy bylo prokázáno, že žádný z rodu *Listeria sensu lato* neobsahuje patogenitu ostrůvku 1 a 2, kdy tyto ostrůvky zahrnují hlavní virulentní geny a patogenní geny, o kterých bude pojednáváno dále.

Všeobecnou výjimkou je *Listeria grayi*. Tato listérie, jako jediná z celého rodu *Listeria sensu lato*, obsahuje geny pro motilitu, které kódují bičíkové proteiny. Fylogenetické analýzy naznačují, že předchůdci *Listeria sensu stricto* a *Listeria grayi* získali celý bičíkový biosyntetický gen přes horizontální přenos genu od předka komplexu *Bacillus cereus*. Gen, který také souvisí s pohybem, ale neobsahuje ho *Listeria grayi*, se označuje mogR. MogR je identifikován pouze u *Listeria fleschmannii*, kdy tento represorový gen (represor je molekula, která se váže na určitý úsek DNA, a brání tak aktivaci určitého genu) je vysvětlením, proč je tento druh nepohyblivý. (DEN BAKKER HC, 2013)

Zajímavá genomová vlastnost byla pozorována u genomových sekvencí pro dva kmeny *Listeria grayi*. Byly zde nalezeny čtyři genomicky shlukované geny, které se označují jako RibD, RibE, RibAB a RibH. Uspořádání těchto genů a přítomnost anotovaného FMN, mají zodpovědnost za biosyntézu riboflavinu. Tato pozorování vedou k závěru, že *Listeria grayi* oproti *Listeria monocytogenes*, by měla být schopna biosyntézy riboflavinu. (CHIARA M. 2015)



Bylo zjištěno, že genomy *Listeria sensu lato* ukázaly podsvětlení genů, spojených s vnitřní doménou ve srovnání s *Listeria sensu stricto*. To značí, že rozšířenost internalinových genů se stalo po rozdělení *Listeria sensu stricto* a *Listeria sensu lato* tím, že kmeny *Listeria sensu lato* pravděpodobně nejsou patogenní u savčích druhů, jelikož vnitřní sloučeniny byly typicky důležité pro interakce mezi listérií a hostitelem jako savcem. (ORSI R. H., 2016) (PIZARRO-CERDÁ J., 2012)

Zajímavostí je, že u *Listeria fleischmannii* subsp. *Coloradonensis* byly nalezeny geny kódující komáří toxin MTX2 z *Bacillus*, který se velice podobá silnému toxinu ETX z *Clostridium perfringens*. Ten způsobuje rychlou smrtelnou enterotoxemii u zvířat, jako jsou ovce, kozy a další středně velká domácí zvířata, což značí, že některé izoláty *Listeria sensu lato* mohou být schopné způsobit onemocnění i u malého hmyzu, jako jsou komáři. (DEN BAKKER HC, 2013)

## 4 PATOGENITA

Ze skupiny *Listeria sensu stricto* mají bakterie lidské a zvířecí patogeny. *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* spolu se čtyřmi dalšími druhy byly izolovány ze zvířat, kdy tato zvířata neměla žádné symptomy, ale listérie se v nich stejně prokázala.

Členové druhé skupiny *Listeria sensu lato* jsou označovány za jediné ekologické mikroorganismy, jelikož nedokáží kolonizovat savčího hostitele. U této skupiny nejsou probádané všechny druhy listérií. Proto nelze stanovit, že jsou všechny druhy nepatogenní. (SCHARDT J., 2017)

Bakteriální patogeny mají virulentní faktory, které je odlišují od jejich nepatogenních protějšků. Tyto geny jsou zakódovány na specializovaných oblastech bakteriálních chromozomů, které jsou označeny jako patogenní ostrovy.

Ostrovy patogenity jsou částí genomických ostrovů, které mohou být získané i prostřednictvím horizontálního přenosu. Patogenní ostrovy jsou velké části chromozomu, které se liší v obsahu nukleotidů a přítomností genetických prvků. Ve srovnání s genomem jádra se ostrov patogenity může lišit sekvencí a složením. Tyto ostrovy umožňují bakteriím přizpůsobit se různým prostředím. Genomové ostrovy jsou součástí skupiny mobilních genetických částic, což jsou segmenty DNA, schopné pohybu v rámci genomu a také přenosu mezi jednotlivými bakteriálními buňkami. (HALLSTROM KN., 2015)

Patogenita *Listeria monocytogenes* je způsobena schopností pronikat a proliferovat v různých typech hostitelských buněk, do kterých mohou spadat i makrofágy a nefagocytární buňky.

### 4.1 Virulence

Stejně jako u všech patogenních bakterií má virulence u fakultativních intracelulárních druhů listérií mnoho faktorových vlastností. Samozřejmě je exprese bakteriálních genů zapojena do několika kroků infekčního procesu, jako je invaze, intracelulární množení a šíření. Exprese je dočasně prostorově řízená činnost, čímž se zajistí přítomnost genových produktů, a to ve správném okamžiku a na správném místě.

Předpokladem vzniku listeriózy je překonání střevní bariéry hostitele. Listérie jako intracelulární patogen invaduje ze střeva do buněk střevních plaků, do jater, centrální nervové soustavy, nebo placenty. Z této cesty listérie vyplývají klinické symptomy, jako jsou sepse,

meningitidy, febrilní gastroenteritidy, subklinická pyogranulomatozní hepatitida, abortus a další. U těhotných žen se mohou objevovat pod obrazem cystitidy, na což by měl klinik dát velký důraz a v diferenciální diagnostice na toto onemocnění pamatovat. (JANČOVÁ J., 2007)

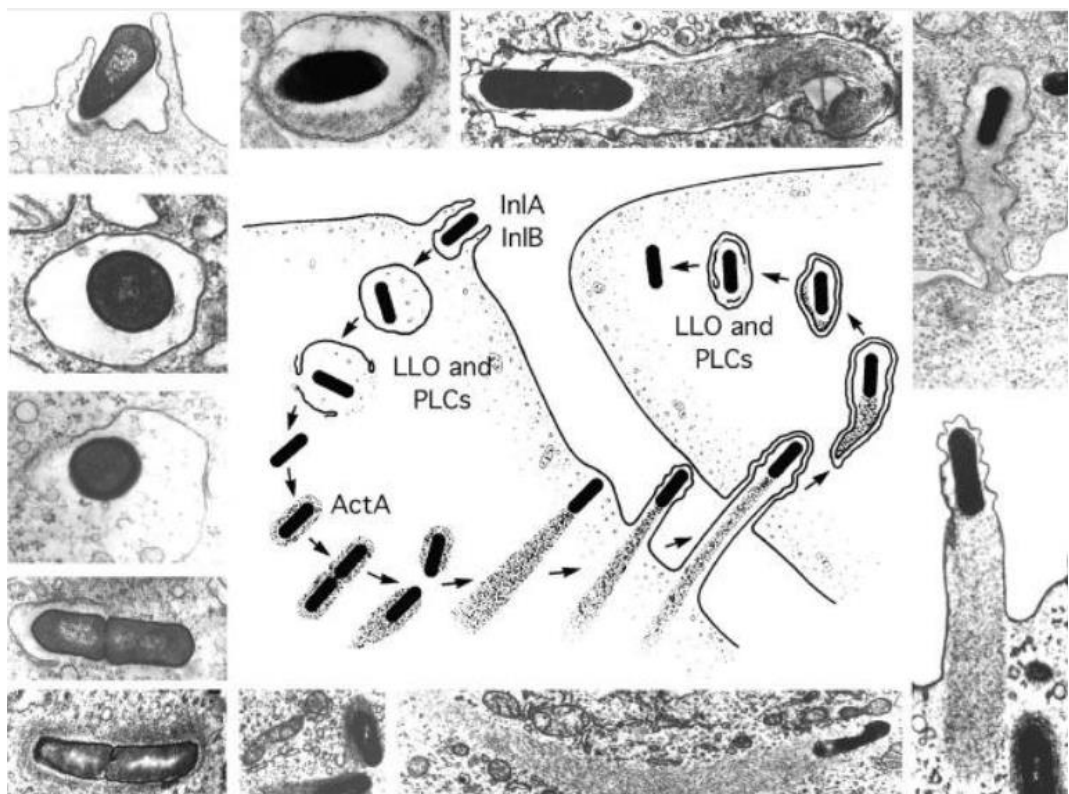
Na regulaci virulence u listérií se podílí skupina genů PrfA, které jsou aktivní při 37 °C, což je mimochodem také tělesná teplota hostitele. Tyto geny jsou ale aktivní i při okolní teplotě s nízkým pH. Klíčový prvek PrfA patří do rodiny transkripčních regulátorů CRP / FNR a řídí expresi hlavních genů virulence *Listeria monocytogenes* během intracelulární infekce. Syntéza a celková aktivita jsou ovlivňovány různými fyzikálně-chemickými signály uvnitř i vně eukaryotických hostitelských buněk. Důležitou informací je, že PrfA jako pozitivní regulační protein A spojující řadu příznaků z životního prostředí, který signalizuje přechod mezi dvěma kontrastními způsoby života a který aktivuje soubor klíčových virulentních faktorů během infekce hostitele. Pozitivní regulační faktor A je umístěný v LIPI-A a částečně i v genech InlA a InlB. Tento protein souvisí i s dalšími geny, jako je listeriolysin O, plcC, plcB, mpl, actA, hpt, InlC a InlJ. (KREFT J., 2001) (DE LAS HERAS A., 2011) (VEGA Y., 2004)

Intracelulární cyklus začíná invazí do hostitelských buněk, kdy je tato invaze zprostředkována povrchovými proteiny internalinem A a internalinem B, nebo též zkráceně nazývané InlA a InlB. Receptor pro povrchový protein internalin A se účastní hlavně invaze do všech typů buněk, ale internalin B se účastní vstupu přímo do hepatocytů. Internaliny způsobují navázání na povrch buňky.

Aby proběhla první proliferace a replikace *Listeria monocytogenes* v cytosolu hostitelské buňky, je základním předpokladem únik bakterie ze sekundárních lysozomů, který je zprostředkovaný listeriolysinem O, který se též zkracuje pouze na LLO, v kombinaci s fosfolipázami, jako je fosfatidylinositolem a fosfolipázou C s aktivitou fosfatidylcholinu, též nazývaným plcA. Tyto složky *Listeria monocytogenes* vylučují a jejich schopností je štěpit vakuolární membránu hostitele a udržovat vhodné pH, které zastaví maturaci fagozomu a tím i aktivaci mikrobicidních systémů buňky.

Intracelulární pohyb *Listeria monocytogenes* a šíření z buňky do buňky se děje díky výčnělkům plazmatické membrány, které jsou způsobeny aktin polymeračním proteinem, kdy tento protein bakterie obaluje. V tomto cyklu se *Listeria monocytogenes* může pohybovat z jedné hostitelské buňky do druhé, aniž by zničila imunitní systém lidských T-buněk nebo buňky přímo usmrtila.

LIPI-1 neboli patogenní ostrov listérií 1, spolu s PAI, který má velikost přibližně 9 kb, obsahuje několik již zmíněných, genů, které podporují patogenezí. Tyto geny zahrnují *plcA* a *prfA*, které společně tvoří operon. LIPI-1 také obsahuje operon lecitinázy, který obsahuje *mpl*, *actA* a *plcB*. *ActA* kóduje aktin polymerizační protein, který polymeruje aktinové filamenty listérie. Gen *plcB* kóduje protein fosfatidylcholin fosfolipázu C, s aktivitou lecitinázy a gen *mpl* kóduje metaloproteázu, která zpracovává gen *plcB* do zralé formy. LIPI-1 obsahuje také *Hly*, který kóduje protein listeriolysin O. Tento protein lyzuje erythrocyty a další buňky, ale také lyzuje vakuoly eukaryotických buněk, což umožní jednoduché šíření se cytoplazmou. (HERNANDEZ-MILIAN, 2014) (HALLSTROM KN., 2015)



**Obrázek 4.** Intracelulární životní cyklus listérie (PORTNOY D. A., 2002)

Soubor základních genů virulence je postupně odhalován u všech kmenů *Listeria monocytogenes*. Pokud vznikne delece jednoho či více genů, který kóduje klíčové faktory virulence, může vést následně k rozdílům v patogenitě. Mutanty *Listeria monocytogenes*, s delecí genů *prfA*, *actA* nebo proteinem listeriolysinem O, se v pokusech vyznačují avirulencí. Tyto pokusy se provádějí zejména u myši. (PORTNOY D. A., 2002) (GELBÍČOVÁ T., 2011)

#### 4.1.1 Změny v patogenitě

Změny v patogenním potenciálu *Listeria monocytogenes* lze popsat bodovými mutacemi genů virulence. Aby mohla bakterie projít intestinální bariérou během počáteční fáze

infekce, je klíčový povrchový protein internalin A (InIA). Tento internalin zprostředkovává interakci s E-kadherinem epiteliálních buněk, kdy kadherin je typ buněčných adhezivních molekul. Po celém světě bylo popsáno několik bodových mutací, které vedou ke vzniku předčasného terminačního kodonu v genu InIA neboli předčasný stop kodon, se zkratkou PMSC.

PMSC, v genu internalinu A, vede k jeho neúplné syntéze, což značí fakt, že má za následek zkrácenou formu tohoto genu. Pokud je tato forma zkrácená, má to za následek sníženou schopnost napadat epiteliální buňky tkáňových kultur a nižší virulenci u savčích hostitelů. V roce 2011 bylo identifikováno 18 přirozeně se vyskytujících mutací, které měly za následek vznik PMSC v genu internalin A. (GELBÍČOVÁ T., 2011)

## 4.2 Biofilm

Tvorba biofilmu v potravinářském průmyslu náleží do vážných problémů, které se musí sledovat a musí být přijímána preventivním opatření k jejich předcházení. Mikroorganismy, tvořící biofilm, přežívají v jinak zcela nevhodném prostředí, na určitých místech, jako jsou plasty, sklo, dřevo nebo kovy. Tvorba biofilmu ulehčí mikroorganismu v mnoha oblastech. Jeden z řady důvodů může být snadná výměna genetického materiálu a přenos živin mezi bakteriemi. Díky schopnosti tvorby biofilmů přežívají i na jinak ne zcela vhodném prostředí, jako jsou již zmíněné potravinářské stroje. Biofilm je velice odolná struktura, která odolává desinfekčním prostředkům a biocidům. Jelikož je tvořen z velké části vodou, brání se tak i vyschnutí.

Biofilmy se vytváří na místech, kde není dostatečná hygiena zařízení a povrchů, které se dostávají do styku s potravinami. Při výrobě potravin nebo jejich balení může docházet k uvolnění a kontaminaci produktů z těchto přístrojů. Pokud k tomu dojde, hrozí kontaminace potravin, snížení jejich trvanlivosti a zvýšení rizika přenosu bakteriálních infekcí, v našem případě listeriózy. (ŠILHOVÁ-HRUŠKOVÁ L., 2016)

Pro kontaminaci stačí pouze krátká kontaktní doba, kdy se bakterie připojí. Listérie pro připojení na povrchy využívají proteiny, bičíky, fimbrie a membrány.

Bylo prokázáno, že sérotypy mohou mít také významný dopad na chování tvorby biofilmu. Sérotypy 1/2a a 1/2b vytvářejí více biofilmu než sérotyp 4b, kdy se tyto sérotypy kultivovaly v médiu bohatém na živiny. V médiu s nízkou výživou byla schopnost tvorby biofilmu podobná u sérotypů 1/2a a 4b, ale zároveň nižší než u sérotypu 1/2b. Celková tvorba biofilmu však není sérotypem nijak ovlivněna. (KOCOT A. M., 2017)

#### **4.2.1 Jednotlivé fáze tvorby biofilmu**

První fáze tvorby biofilmu zahrnuje reverzibilní adhezi. Pokud se bakterie nachází nad 50 nm od povrchu, začínají probíhat gravitační, elektrostatické síly a van der Waalsovy síly, které napomáhají k integraci. V tomto stádiu se největší význam pro adhezi připisuje bičíkům a fimbriím. Bylo prokázáno, že na této počáteční adhezi se podílí i extracelulární DNA, která se také podílí i na celkové organizaci biofilmu.

Druhým stupněm je irreverzibilní adheze, která je indukovaná silnějšími interakcemi na povrchu bakterií. Tato interakce má ještě menší vzdálenost od povrchu, menší než 1,5 nm. Adheziny, nebo též nazývané ligandy, jsou vystaveny na povrchu buněk. Ligandy umožňují vytvoření vazby, která funguje na principu klíče a zámku mezi bakterií a povrchem. Tato adheze je navíc doprovázena sekrecí exopolysacharidu, která obklopuje vytvořený biofilm, díky němuž může probíhat přenos genetického materiálu a přenos živin.

Předposledním krokem je tvorba mikrokolonií a zvětšení objemu biofilmu. Tvoří se zde charakteristická architektura biofilmu neboli zrání biofilmu.

Konečným krokem je disperze bakterií do prostředí, a to díky vytvoření příliš husté vrstvy biofilmu. (KOCOT A. M., 2017) (GUILBAUD M., 2014)

## 5 VÝSKYT

Nejčastěji vyskytovanou a zkoumanou listérií je *Listeria monocytogenes*. Primární cesta přenosu listérie na člověka je pomocí konzumace kontaminovaných potravin. Statistiky ohledně listérií, které se konaly v roce 2007, se vyčíslily na incidenci 0,3 případů/100 000 obyvatel v EU a 0,5 případů/100 000 obyvatel v ČR. Závažnost této potravinové zoonózy spočívá ve vysokých úmrtnostech až do výše 30 %. Tyto bakterie lze izolovat z různých zdrojů, jako je půda, rostliny, voda, siláž a krmiva, stejně jako z prostředí v potravinářství a potravin obecně. *Listeria monocytogenes* má důležité charakteristiky jako je tolerance k vysokým koncentracím soli a nízkému pH. Přítomnost listérie v potravinách je mimo jiné spojena se schopností přetrvávat v prostředí potravinářských rostlin a tvorbou biofilmu na povrchu zařízení, která slouží ke zpracování potravin. Nemoc se může vyvinout po konzumaci obsáhlé škály potravin, jako jsou mléčné výrobky, masné výrobky, lahůdky a zelenina.

V některých zemích mají právní předpisy nulovou toleranci na přítomnost *Listeria monocytogenes* v potravinách, jako je například v USA. V zemích EU byla nařízením Komise (ES) č. 2073/2005 stanovena pro maloobchodní trh hranice nižší než  $10^2$  CFU/g pro potraviny připravované k přímé spotřebě, kdy tento limit je považován za bezpečný pro spotřebitele. Pro zdravé lidi je infekční dávka  $10^8$  CFU/g, ale u citlivých osob je infekční dávka  $10^2$ - $10^3$  CFU/g. (GELBÍČOVÁ T., 2009)

Nejvyšší úmrtnosti způsobená listeriózou, je datována od roku 1964. Tato nemoc s nejvyšší úmrtností postihla zejména USA, Čínu, Dánsko a Španělsko. Přehled úmrtnosti v těchto zemích je znázorněn v tabulce č. 1.

Země	Rok	Míra úmrtnosti [%]
USA	2009-2011	17,6
Čína	1964-2010	26
Dánsko	1994-2003	21
Španělsko	2011	20 - 30
Malorka	2002-2012	25
Madrid	1986-2007	24,3
Barcelona	2011	14

**Tabulka 1** – Míra úmrtnosti související s *Listeria monocytogenes* (BRYCHTA J., 2015)

## 5.1 Nálezy v České republice

Po zkoumání v letech 2004–2008 byla *Listeria monocytogenes* detekována v 55 z 2180 analyzovaných vzorků potravin. Nejčastější výskyt byl u lahůdkových výrobků, jenž činil 5,2 %, u masných výrobků činil 3,4 % a u mléčných výrobků 1,8 %. V České republice byla také zjištěna tato bakterie u uzených ryb, která se vyskytovala u 1,7 % těchto rybích produktů. Důležitou informací je to, že nikdy nebyl překročen limit počtu 102 CFU/g.

V období studie byla *Listeria monocytogenes* detekována ve 36 neboli 3,4 % vzorcích masa. Proto byla pozornost zaměřena na charakterizaci izolátů z těchto druhů zboží. Nejčastějším sérotypem byl 1/2a, v procentuálním zastoupení 44,4 %. Následoval 1/2c s 19,4 % a 1/2b s 16,7 %. Takové zastoupení se objevilo i u balených ryb a hovězího masa v Litvě, což značí fakt, že takovéto sérotypy jsou nejzastoupenější u kontaminovaných potravin bakterií *Listeria monocytogenes*.

Třiatřicet izolátů *Listeria monocytogenes* bylo získáno 83 % z krájených produktů masných výrobků. Takováto kontaminace produktů nastává již ve výrobě nebo také v důsledku následné manipulace, skladováním nebo distribucí potravin. Kontaminace ve výrobě je nejčastěji zapříčiněna špatnou údržbou strojů na krájení, což umožňuje následný přenos bakterie mezi povrchem tohoto kráječe a produktem. Tato kontaminace se stala v roce 2008 v Jablonci nad Nisou, v jednom supermarketu, kdy byla *Listeria monocytogenes* objevena v salámu Vysočina, Herkules, Turista, Gothaj a v krutí šunce. (BĚRZINŠ, 2009)

Analýza se provádí i u pasterovaných kravských mlék, zralých sýrů, zmrzlin a u másla. Nejzajímavější detekce *Listeria monocytogenes* byla ve zmrzlinách a v modrém sýru neboli Nivě. Nejvyšší míra detekce byla v roce 2006 a 2007, kdy ke kontaminaci došlo již při výrobě Nivy. Všechny analyzované kmeny byly zařazeny do sérotypu 1/2a a byly klonálně identické, což značí stejný pulzotyp, v tomto případě pulzotyp 719. Určení pulzotypů je prováděno metodou pulzní gelové elektroforézy, která se značí zkratkou PFGE.

Všechny výsledky naznačují opakovanou kontaminaci zralých sýrů po dobu několika let a možnou přítomnost přetrvávajících kmenů *Listeria monocytogenes* ve výrobním závodě. Až v roce 2008 byly všechny vzorky Nivy negativní, pravděpodobně z důvodů nápravných opatření v mlékárně. (GELBÍČOVÁ T., 2009)



## 5.2 Nálezy v Polsku

Listerióza byla zaznamenána ve větší míře i v Polsku v roce 2012, kdy se *Listeria monocytogenes* objevila ve velkém množství u ryb a rybích produktů. Průměrná spotřeba ryb na obyvatele v Evropské unii činila 23,9 kg a v Polsku byl tento průměr 12,0 kg na člověka. I když se jednalo o nižší průměr než v Evropské unii, tak to mělo taktéž neblahý dopad na zdraví obyvatel Polska, kteří tyto kontaminované ryby konzumovali.

Evropský úřad pro bezpečnost potravin uvedl, že počet nízkých epidemií listeriózy je spojen s nižší spotřebou ryb a rybích produktů ve srovnání s jinými potravinami v Evropě. V roce 2014 bylo identifikováno na 2161 případů lidské listeriózy v EU, z toho bylo 210 smrtelných, způsobených právě nemocí listeriózou. V Polsku bylo pouze 86 případů za rok 2014 a v roce 2013 to bylo pouhých 58 případů spojených s listeriózou.

Celkově bylo v Polsku 57 z 301 vzorků pozitivních na *Listeria monocytogenes* izolováno z čerstvých uzených ryb, což činilo 18,9 %. Nejčastěji byly bakterie objeveny u čerstvého lososa, s 32,0 % a uzeného lososa, s 33,8 %. Objeveny byly i u čerstvé tresky, s 31,8 %. Pouze tři vzorky uzeného lososa byly kontaminovány bakteriemi nad 100 CFU / g. Nejčastěji nalezeným sérotypem byl 1/2a-3a, které se našly ve vzorcích mořských a sladkovodních ryb. 33 kmenů těchto sérotypů bylo zjištěno u vzorků mořských ryb a 7 izolátů u sladkovodních ryb, což dohromady činilo 70,2 % tohoto sérotypu. Podobná prevalence byla i u sérotypu 1/2b – 3b – 7, která byla identifikována u 11 mořských a 3 sladkovodních ryb. Všechny izoláty obsahovaly 10 genů s virulencí obsahující InlA, InlB, InlC, InlJ, plcA, plcB, hlyA, acta a mpl. Většina z nich taktéž obsahovala flaA. (WIECZOREK K., 2017)

## 5.3 Nálezy na Slovensku

Na Slovensku se v letech 2011 – 2014 začaly shromažďovat vzorky z různých potravinářských oblastí, jelikož bylo hlášeno mnoho případů listeriózy. Největší počet listeriózy na Slovensku byl v roce 2011, kdy nemoc postihla 31 lidí. Pro analýzu bylo přijato 639 vzorků, z nichž 216 vzorků z kontaktních oblastí s potravinami a 283 z oblastí potravinářského kontaktu a vybavení, do něhož patřily i rukavice, příkrývky, stěny, podlahy, krmiva a mnoho dalších materiálů. Zbylých 140 vzorků bylo odebráno z mléka, hrudkového sýru a sýru bryndza.

Z celkového počtu izolovaných vzorků bylo 3,1 % neboli 20 vzorků pozitivních na *Listeria monocytogenes*. *Listeria ivanovii* byla detekována pouze ve dvou vzorcích, ale v 309 dalších vzorcích byly detekovány další druhy listérií.

K detekci byla použita metoda dle ISO 11290-1, kdy bylo zahrnuto obohacení ve Fraserově bujónu na 24 hodin při 30 °C. Po inkubaci v bujónu se očkovalo na chromogenním ALOA agaru za účelem získání dobře izolovaných kolonií. Po aplikaci PCR metody pro zjištění sérovarů a typizaci PFGE na izoláty, v tomto případě na izoláty *Listeria monocytogenes*, byla zjištěna vysoká kmenová rozmanitost, což značí kontaminaci pocházející z vnějšího prostředí. (VÉGHOVÁ A., 2015)

#### **5.4 Nálezy v Německu**

Největší nálezy probíhaly v Německu od roku 2012 do roku 2015, kdy bylo v Německu izolováno 793 izolátů. Na tyto izoláty bylo oznámení nemoci listeriózy.

Celkem bylo zaznamenáno 66 epidemických případů, kdy pouze v roce 2015 bylo 28 případů. Čtyři případy, z celkových 66 byly spojeny s těhotenstvím a ostatních 62 tvořili pacienti, kteří nemohli být spojeni s těhotenstvím, jelikož to byli muži. Nejvíce bylo postihnuto listeriózou 38 seniorů, nad 70 let života. Ve skupině osob ve věku 18 až 69 let bylo nakaženo 23 osob a jedno dvouleté dítě. Šest osob onemocněním podlehl, přičemž tři prokazatelně na listeriózu.

V jižním Německu bylo zaznamenáno nejvíce případů listeriózy, které se vyšplhaly až k 60 % úmrtnosti a od roku 2012 byly pozorovány lidské izoláty *Listeria monocytogenes* se sérotypem 1/2a.

Všechny izoláty byly testovány pomocí PFGE pro klonální vztahy. (RUPPUTSCH W., 2015)

#### **5.5 Nálezy v Rakousku**

V Rakousku se objevila nemoc listerióza v roce 2011 a ta se objevovala až do léta roku 2013, kdy došlo k sedmi lidským případům listeriózy. Díky pulsní gelové elektroforéze byl více prozkoumán sérovar 1/2b, jenž se stal v roce 2012 dominantním kmenem listérií, který se nacházel čím dál více u izolátů z potravin.

Analýza listérií v tomto období ukázala sedm lidských případů invazivní listeriózy, způsobených *Listeria monocytogenes*, se sérovarem, též nazývaným klastrem 1/2b. Tento klastr se objevil u žen s průměrným věkem 75 let a dva případy měly fatální následky. Listérie byly izolované z masných a mléčných výrobků, jakožto z plátků vepřové šunky, měkkého sýra a čerstvého ovčího sýra.

Po zjištění primární kontaminace potravin se zavedla kontrola a testování každé výrobní šarže ve výrobě dané kontaminované potraviny. V případě masny byla nákaza odstraněna vyčištěním kontejneru na krájení masa, který byl enviromentálním dozorem identifikován jako možný zdroj kontaminace listérií. (SCHMID D., 2014)

## 6 NORMY

### 6.1 Norma EN ISO 11290 (560093)

ISO je celosvětová federace národních normalizačních orgánů. Technické výbory ISO připravují mezinárodní normy. Tuto práci mohou provádět i mezinárodní organizace, vládní i nevládní organizace ve spolupráci s ISO. ISO též úzce spolupracuje s mezinárodní elektrotechnickou komisí, která má zkratku IEC, na všech záležitostech ohledně elektrotechnické normalizace.

#### 6.1.1 Zrušená norma: Norma ČSN EN ISO 11290 (560093)

Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – část 1: Metoda průkazu. Tato norma byla schválena od roku 1999 a její funkčnost byla až do 1. 1. 2018, kdy byla zrušena. Norma je českou verzí evropské normy EN ISO 11290:1996, která má status technické normy. ISO 11290 sestává ze dvou částí, kdy první část je s názvem: Metoda průkazu. Druhá část nese název: Metoda stanovení počtu.

V úvodu normy se upozorňuje na to, že vzhledem k velké různorodosti výrobků, které jsou potravinami a krmivy, nemusí být tato horizontální metoda ve všech detailech pro všechny výrobky vhodná. Pro některé výrobky je nezbytné použít odlišné metody. V Závěru je uvedeno Varování: Z hlediska ochrany zdraví laboratorních pracovníků je nezbytné, aby se zkoušky k průkazu bakterií rodu *Listeria monocytogenes* prováděly výhradně v laboratořích k tomu účelu vhodně vybavených, řízených zkušeným mikrobiologem a za podmínky, že s veškerými inkubovanými materiály se nakládá s velkou opatrností. Zvláště se doporučuje, aby s kulturami *Listeria monocytogenes* nepracovaly těhotné ženy. První část normy specifikuje horizontální metodu průkazu *Listeria monocytogenes*. Se zohledněním omezení, která jsou diskutována v úvodu, platí tato první část (ČSN EN) ISO 11290 pro výrobky určené k lidské výživě nebo ke krmení zvířat. Princip metody i postup při provádění normalizované zkoušky je podrobně popsán. Norma tedy stanovuje základní postupy pro stanovení mikrobiálního kontaminantu potravin významného pro hygienu výživy.

Norma byla rozsáhlá, měla 28 stran formátu A4. Byla i možnost vyhledání v českém jazyce. [ČSN EN ISO 11290-2 (560093), 1999]

#### 6.1.2 Nové vydání: ČSN EN ISO 11290 (560093)

Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* a *Listeria spp.* - část 1: Metoda průkazu. Tato norma nahrazuje

předešlou normu, která byla popsána v podkapitole výše. Byla schválena 1. 12. 2017 a její účinnost nabyla 1. 1. 2018.

Anotace obsahu normy: Tento dokument, který určuje horizontální metody pro detekci *Listeria monocytogenes* a detekci bakterií *Listeria spp.*. Dokument platí pro produkty určené k lidské spotřebě a krmení zvířat a pro vzorky životního prostředí v oblasti výroby potravin a zpracování potravin. Některé dodatečně popsané druhy *Listeria* mohou být touto metodou zjištěny nebo potvrzeny.

Změny v této normě, oproti předešlé, jsou následující:

- Primární obohacení v médiu dle Fräsera s poloviční dávkou antibiotik se provádí inkubace po dobu 25 hodin  $\pm$  1 hodina
- Sekundární obohacení v médiu dle Fräsera s poloviční dávkou antibiotik je nastavena inkubace na 24 hodin  $\pm$  2 hodiny
- Fraserův bujón s poloviční dávkou antibiotik a Fraserův bujón mohou být chlazeny před izolací na selektivním agaru po dobu nejvýše 72 hodin
- Při skladování izolačních destiček mohou být inkubované destičky chlazené maximálně 2 dny před použitím
- Mikroskopický pohled pro potvrzení je volitelný, pokud však izolační agar umožňuje rozlišit patogenní a nepatogenní *Listeria spp.*
- CAMP test a kataláza test jsou nepovinné
- Zahrnutí nových charakteristických výkonů
- Detekce bakterií *Listeria spp.* byla zahrnutá do rozsahu práce a název byl odpovídajícím způsobem změněn

Norma je rozsáhlá, obsahuje 52 stran formátu A4. Je dohledatelná pouze v anglickém jazyce, ale již se připravuje k převzetí do českého jazyka. [ČSN EN ISO 11290-2 (560093), 2017]

## 7 METODY STANOVENÍ

Vzorky, které se používají pro stanovení bakterií, se odebírají z různých zdrojů, jako jsou farmy, výrobní, potravinové podniky a další náhodná environmentální prostředí. Odebírané vzorky jsou nejčastěji z mléka, sýrů a celkově mléčných výrobků, z fekálií, z vody a různých potravin. U mléka z krav, koz nebo ovcí se vzorky odebírají buď mechanicky nebo ručně. Laboratorní průkaz listérií se provádí i z klinického materiálu, jako je likvor, hemokultura, stolice, hnis, výtěr z krku, plodová voda, moč, spojivkový vak a punktát. Nejčastěji se vzorky odebírají v období léta, kdy jsou listérie nejvíce aktivní.

Ke sledování virulence je možné využití zkoušek *in vivo* na myších, či techniky *in vitro*, které jsou prováděny na tkáňových kulturách nebo molekulárně biologické metody, jako jsou PCR, RFLP, Western blot analýza či sekvence. Tyto metody moderní mikrobiologie využívají principy z biochemie, imunochemie, biofyziky nebo molekulární biologie. Metody umožňují rychlejší stanovení bakterií ve srovnání s klasickými kultivačními metodami.

Všechny metody stanovení začínají izolací vzorků. Následuje selektivní obohacení podle ISO 11290. Vládní agentury, které je schvalují jsou pro příklad: Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), BAM nebo Ministerstvo zemědělství USA (USDA).

Všechny laboratorní vyšetření se provádí podle EN ISO 11290- 1,2. Zavedení moderních mikrobiologických technik do těchto mezinárodních ISO norem, které jsou doporučované legislativou pro mikrobiologickou kontrolu potravin, je zdlouhavá cesta a závisí ve velké míře na validačních studiích, které potvrzují spolehlivost naměřených výsledků. (DEMNEROVÁ K., 2012) (BRYCHTA J., 2011)

### 7.1 Izolace

Před metodou stanovení vzorků bakterií se vždy musí vzorky připravit a izolovat. Podle původu vzorku se použijí metody izolace. Izolace a identifikace není u listérií obtížná.

Izoluje se nejčastěji na krevní agar, kde je prokazatelně vidět hemolýza. Selektivní pomnožení se provádí v polovičním Fraserově bujónu po dobu 24 hodin při 30 °C. Sekundární pomnožení se provádí ve Fraseru, s plným obsahem antibiotik, na 48 hodin při 37 °C. Po tomto pomnožení se listérie identifikují vždy nejméně na dvou pevných selektivních médiích, kdy inkubace trvá 48 hodin při 37 °C.

U silně kontaminovaného materiálu, jako jsou stolice, stěry z dutiny ústní a poševní výtěry, se využívají selektivní půdy. Speciální selektivní půdy pro listérie jsou například

*Listeria* selective agar neboli PALCAM agar, na kterých je růst ostatních mikroorganismů potlačen, ALOA agar a OXFORD agar. (JANČOVÁ J., 2007)

Všechny izoláty jsou podrobeny standardním biochemickým zkouškám, jako je Grammovo barvení, test na katalázu, pohyblivost neboli motilita bakterií při 25 °C a zároveň i při 37 °C, reakce s mannitolem a xylózou. Potvrzení izolátů se provádí měřením dalších biochemických reakcí, jako je hemolytická aktivita neboli  $\beta$ -hemolýza pomocí CAMP testu. Bakteriální izoláty jsou kultivovány i v TSA agaru při 37 °C po dobu 18 hodin. Izoláty jsou naočkovány na krevní agar, kde se inkubují 24 hodin při 37 °C za anaerobních podmínek. (ATIL E., 2011)

### **7.1.1 PALCAM agar**

PALCAM agar je vysoce selektivním médiem kvůli přítomnosti chloridu lithného, Ceftazidimu, Polymyxinu B a Acriflavinu. Médium obsahuje dvojí indikátor. První z indikátorů je eskulin a citrát amonno-železitý. Druhý indikátor obsahuje manitol a fenolovou červeň.

Jako hlavní zdroj živin pro organismy jsou pepton a glukóza. Další složkou média jsou dextróza, škrob a mannitol, které fungují jako energetický zdroj. Pro udržení osmotické rovnováhy slouží chlorid sodný.

Pokud listérie hydrolyzují eskulin, dochází k tvorbě černé opalescence kolem kolonií díky přeměně eskulinu na eskuletin, který tvoří komplexy s železitémi kationty, což vytváří hnědě černou haló zónu kolem kolonií.

Listérie nekondenzuje mannitol, čímž je snadno rozlišitelná od enterokoků a stafylokoků, kteří mannitol fermentují. Při fermentaci mannitolu dochází ke změně agaru z červené barvy na žlutou, na čemž má zásluhu fenolová červeň, která indukuje změnu pH média. Díky tomuto rozlišení jsou listérie na agaru zelenošedé barvy s haló zónou kolem kolonií a nezměněnou barvou agaru.

Nachází se zde i vaječný žloutek, který se do média přidává pro pomoc při opravě poškozených buněk. (HIMEDIA<sup>®</sup>, 2015)



**Obrázek 5** – PALCAM agar (E & O LABORATORIES LTD, 2018)

### 7.1.2 ALOA agar

ALOA agar je selektivní médium pro izolaci, výčet a identifikaci druhů *Listeria* ze vzorků potravin.

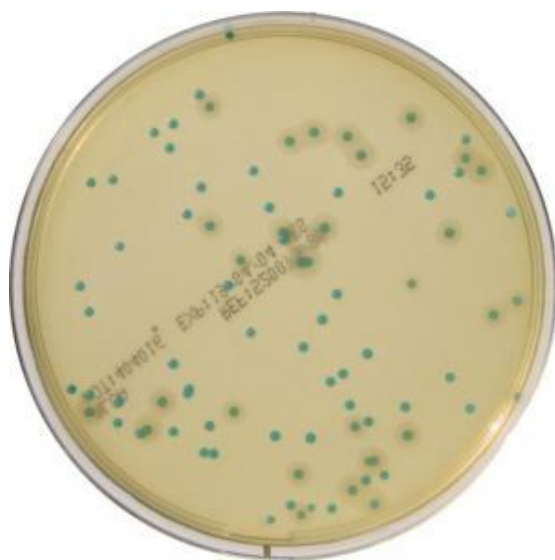
Bujón se skládá z masového peptonu, kaseinového peptonu, kvasničného extraktu a glukózy, kdy všechny tyto složky jsou bohaté na živiny. Pyruvát sodný a glycerolfosforečnan hořečnatý slouží pro ochranu před letálními účinky inhibičních látek. V mnoha bujónech, tak i v ALOA agaru, se nachází chlorid sodný, ale navíc i hydrogenfosforečnan disodný. Tyto dvě látky slouží jako pufrovací systém bujónu. Chlorid lithný a síran hořečnatý náleží mezi inhibiční látky, které inhibují doprovodnou mikroflóru. Médium obsahuje Amphotericin, jenž inhibuje růst kvasinek a jiných forem, které mohou být ve vzorku přítomny. Ceftazidim, sodná sůl kyseliny nalidixové a Polymyxin B síran inhibují enterokoky a i jiné mikroorganismy.

Pro identifikaci *Listeria* spp. slouží jako indikátor tohoto média 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glukopyranosid. Tento chromogen se štěpí  $\beta$ -glukosidázou, která je společná u všech druhů listérií. Štěpením vznikají modrozelené kolonie. Tento enzym obsahují i jiné mikroorganismy, jako jsou enterokoky, ale tyto mikroorganismy jsou inhibovány selektivními činidly.

Listérie jsou schopny produkovat fosfolipázové enzymy, čímž dokáží hydrolyzovat fosfatidylinositol nebo lecithin v médiu a tím vzniká neprůhledný bílý haló efekt kolem kolonií. Pokud médium obsahuje fosfatidylinositol, prokazuje se *Listeria monocytogenes*, jelikož



ta produkuje fosfatidylinositol fosfolipáza C neboli PI-PLC, která detekuje daný substrát. Alternativním přidáním lecithinu, místo fosfatidylinositolu, lze detekovat aktivitu fosfatidylcholinu-fosfolipázy C, která je spojena s virulencí listérií, čímž se značí užitečností indikátoru patogenity. Fosfolipázové enzymy dokáží produkovat pouze listérie ze skupiny *Listeria sensu stricto*. (AES CHEMUNEX, 2008)



**Obrázek 6**– ALOA agar (DIAMEDICA, 2008)

### 7.1.3 OXFORD agar

OXFORD agar je selektivní identifikační médium pro izolaci a identifikaci listérií v potravinářských a klinických laboratořích.

Hlavní složkou agaru je chlorid lithný, který má za funkci inhibici enterokoků. Druhou hlavní složkou agaru je akriflavin, jenž působí inhibičně na některé gram-pozitivní a gram-negativní organismy. OXFORD agar je méně výživným agarem. Výživné složky agaru jsou pepton a škrob. Chlorid sodný zde působí pro udržení osmotické rovnováhy.

Na inhibici kvasinek jsou do média přidávána antimikrobiální látky Cefoxitin, Kolistin, Fosfomycin spolu s Amfotericinem. Jako indikátor je přítomen eskulin, který hydrolyzují listérie. Díky přítomnosti citrátu amonno-železitým vede k reakci, kdy listérie hydrolyzují eskulin na eskuletin, čímž dochází ke vzniku černých sraženin kolem linií. Tyto sraženiny jsou komplexy, které eskuletin tvoří s železitymi kationty. (EO Labs-PP0630, 2018)

Nově nalezené listérie, jako *Listeria fleischmannii*, byly izolované na OXFORD agaru, kde měly kolonie hnědé až černé, ale narostly až po dvou týdnech při 4 °C. (BERTCH D., 2013)

Oproti tomu *Listeria booriae* a *Listeria newyorkensis* narostly na tomto agaru po 24 hodinách při 30 °C. Kolonie byly rozmazané, kulaté a cínové barvy s černou opalescencí kolem kolonií. (WELLER D., 2015)



**Obrázek 7**– *Listeria* (OXFORD) agar (E & O LABORATORIES LTD, 2018)

## 7.2 Vyšetření sérotypu

Sérotypy jsou určeny pomocí sklíčkové aglutinace, na kterou se používají komerčně dostupná antiséra, ale musí být následně potvrzený výsledek pomocí PCR metody. Na PCR jsou použity PPP polymerasy a primery. (GELBÍČOVÁ T., 2011)

## 7.3 Chromogenní média

Výrazným pokrokem, v oblasti kultivačních metod, bylo zavedení moderní kategorie diagnostických půd, do které spadají chromogenní média. Chromogenní média dokáží odlišit jednotlivé mikroorganismy na úrovni jednotlivých rodů, ale i na úrovni specifických druhů. Rozlišení funguje na základě specifické reakce mikroorganismů se složkami média, kdy se tato reakce projeví odpovídající barvou jejich kolonií. Jejich složení není známo, a to z toho důvodu, že si toto složení výrobci ponechávají v tajemství.

V současné době je na trhu celá řada chromogenních půd od různých firem, které od sebe dokáží odlišit i patogenní bakterii *Listeria monocytogenes* od *Listeria ivanovii* a samozřejmě i od ostatních nepatogenních druhů listérií, a to i s použitím jedné misky. Médium nese název *Listeria Agar* a je vhodné pro izolaci, stanovení počtu a také identifikaci listérií ze vzorků různých potravin. Kultivace na této chromogenní půdě trvá až 24 hodin.

Většina chromogenních médií se stala základem současných kultivačních ISO norem. (DEMNEROVÁ K., 2012)

## **7.4 Imunochemické metody**

Imunochemické metody jsou založené na interakci mezi protilátkou a antigenem. Pro stanovení mikroorganismů se využívají buď monoklonální, polyklonální protilátky či rekombinantní protilátky vytvořené proti antigenním strukturám, které jsou charakteristické pouze pro rod *Listeria*. U monoklonálních protilátek slouží jako antigen virulentní protein a u polyklonálních mohou být antigenem celé usmrcené buňky. (DEMNEROVÁ K., 2012) (BLAŽKOVÁ M., 2005)

Imunochemické metody mají řadu výhod, jako je rychlost a jednoduchost provedení, specifita, detekce bakterií v komplexní matrici, nenáročné laboratorní vybavení a relativně i nízká cena. Jediná nevýhoda těchto technik je náročná příprava specifických protilátek, které mají vysokou afinitu k danému analytu. Kvalita těchto specifických protilátek ve velké míře ovlivňuje detekci.

Imunochemické metody jsou nejvíce rozšířené v klinické biochemii, ale také v analýze potravin a ve veterinární medicíně. Pro vychytávání patogenů ze vzorků slouží magnetické kuličky, které jsou celé pokryté protilátkami. Patogeny jsou dále detekovány buď kultivací na chromogenním médiu nebo využitím PCR se specifickými primery.

### **7.4.1 ELISA**

Enzymová imunoanalýza na pevné fázi, též nazývaná ELISA metoda, je jedna z nejčastěji využívaných imunochemických metod pro detekci bakterií. Při této metodě je protilátka připevněna na pevný nosič a poté je přidán vzorek, který obsahuje buňky mikroorganismů. Tyto mikroorganismy interagují s navázanou protilátkou na nosičích. Nenavázané mikroorganismy se následně odstraní a aplikuje se druhá protilátka, která je již značená enzymem. ELISA je v uspořádání tzv. sendvičového formátu.

Aby metoda mohla hladce proběhnout, je nutné, aby daný antigen měl alespoň dva epitopy, které interagují s protilátkou. Před vlastní reakcí je nutné namnožit bakterie ve vzorcích potravin pomocí běžných kultivačních metod. Stanovení velkého množství vzorků se provádí metodou s použitím mikrotitrační destičky. Tato destička je vyrobena z polystyrenu.

Konečná kvantifikační detekce je uskutečněna enzymovou reakcí, kdy se měří intenzita zabarvení. Pro již zmíněnou barevnost je nutné zabarvení bezbarvého substrátu.

## 7.4.2 Imunochromatografické testy

Imunochromatografické testy se též nazývají LFIA. Tyto testy taktéž náleží do imunochemických metod. V poslední době se tyto testy začaly využívat pro detekci různých látek. Výhodou této metody je rychlé, nenáročné a jednoduché přístrojové vybavení, jež umožňuje realizaci v provozních podmínkách a nevyžaduje téměř žádné pracovní zkušenosti.

Pro tuto metodu je zapotřebí nitroso-celulosová membrána, na kterou se nanáší testovaný vzorek. Vzorek po přidání na tuto membránu náhle postupuje testem. Vzorek se nejprve dostává do kontaktu s barevným konjugátem, který má na sobě navázanou protilátku, kdy tento konjugát rozpustí a poté společně vzlínají danou membránou.

Je-li však ve vzorku přítomen antigen, což způsobí interakci s protilátkami a vytváří se imunokomplex. Imunokomplex migruje porézní vrstvou nitro-celulosové membrány. Zapojují se zde kapilární síly, díky kterým vzlíná imunokomplex až k testovací zóně. V této testovací zóně interaguje se specifickými protilátkami, které jsou imobilizované na membráně, což se projeví vznikem barevné linky v testovací oblasti.

Ke kontrole funkčnosti testu je na membráně přítomná i tzv. kontrolní zóna. Na této kontrolní zóně se nachází imobilizovaná protilátka, která je připravená proti imunoreaktantu konjugovanému k barevné částici. Přebytek konjugátu vzlíná až k této zóně s následným navázáním. Další vytvořená linka potvrzuje správné provedení testu.

## 7.5 Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody jsou další moderní metody pro stanovení mikroorganismů. Tyto metody jsou založené na principu řetězové polymerázové reakce a na znalosti genomu detekovaného mikroorganismu.

V reakci se používají ty části genomu, které jsou pro daný mikroorganismus charakteristické. Detekce takové sekvence ve zkoumaném materiálu indikuje přítomnost konkrétního mikroorganismu.

### 7.5.1 PCR

Metoda PCR neboli celým názvem polymerázová řetězová reakce, je kvantitativní enzymová metoda, umožňující namnožení určitého úseku DNA *in vitro*. DNA se izoluje ze vzorku či z celé kolonie. Právě díky PCR metodě byly poprvé objeveny nové druhy listérií, jako *Listeria fleischmannii*, *Listeria marthii* a *Listeria rocourtiae*. (BERTCH D., 2013)

Prvním krokem PCR je izolace DNA, kdy se oddělí vlákna dvoušroubovice pomocí teplotní denaturace, kdy tato teplota přesahuje 90 °C. Následuje hybridizace primeru ke komplementárnímu úseku DNA při 45 – 65 °C a prodloužení připojeného primeru termostabilní DNA polymerázou při 72 °C, kdy probíhá syntéza druhého řetězce. Primer se značí jako krátká sekvence nukleotidů.

DNA slouží jako templát PCR, kdy jsou do reakční směsi přidány primery, které jsou specifické pro konkrétní mikroorganismus. Specifické primery jsou navrženy tak, aby na základě znalosti sekvence genomové DNA a jejího porovnání s DNA ostatních mikroorganismů, umožňovaly amplifikovat pouze takový úsek DNA, který je vysoce specifický pro detekovaný organismus.

Detekce nasynthetizovaného produktu neboli fragmentu DNA, který má danou velikost, spočívá v obarvení tohoto daného produktu barvivem ethidium bromid nebo SYBR green barvivem, kdy se barvivo váže do dvouřetězové DNA. Po obarvení následuje elektroforéza v agarózovém gelu a konečná vizualizace pod UV lampou. Mohou se také použít radioaktivně nebo fluorescenčně značené primery, které se po elektroforetickém dělení detekují pomocí měření fluorescence nebo také autoradiograficky. (BLAŽKOVÁ M., 2005)

Pozitivní reakce u PCR metody svědčí o přítomnosti testovaného mikroorganismu, případně patogenu, v testovaném potravinovém vzorku. Nevýhodou je, že pozitivní výsledek nic neříká o množství nebo počtu mikroorganismu v daném testovaném vzorku. (DEMNEROVÁ K., 2012) (GELBÍČOVÁ T., 2010)

### **7.5.2 Real-time PCR**

Díky této metodě se provádí detekce a kvantifikace mikroorganismu ve vzorku. Detekce vznikajících produktů probíhá již v průběhu všech cyklů PCR a nikoli až po jejich skončení. Metoda zjišťuje přítomnost a množství patogenu ve vzorku, kdy potvrzení amplifikovaného fragmentu DNA, o určitém počtu bází, se zjišťuje pomocí fluorescenčního signálu. Fluorescenční signál se zvyšuje s narůstající koncentrací DNA v reakční směsi.

Záznam síly fluorescenčního signálu závisí na fluorescenčním činidlu, kdy se používají buď specifické nebo nespecifické sondy. Specifická sonda je taková sonda, která má fluorescenčně značenou synteticky připravenou krátkou sekvenci nukleotidů, která je komplementární s hledaným úsekem. Nárůst fluorescence je zapříčiněn hybridizací mezi hledaným úsekem nukleové kyseliny stanovené bakterie a sondou, která je štěpena

polymerasou během elongace řetězce. Nespecifická sonda je taková sonda, která se váže nespecificky do dvouřetězové DNA. Příkladem takové sondy je SYBR green.

Zvýšená míra fluorescence je zapříčiněna nárůstem množství vznikajících produktů neboli počtem molekul dvouřetězové DNA. Tato rychlost nárůstu fluorescence je úměrná počtu kopií genu, který je typický pro sledovaný mikroorganismus v templátu DNA reakce.

Pro přesnost kvantifikace je důležité sestavit kalibrační křivku ze standardních vzorků o známém množství buněk a prahový cyklus, což je cyklus, ve kterém je již měřitelný nárůst fluorescence ve vzorku. Z těchto dvou veličin lze následně určit počet kopií DNA daného mikroorganismu v neznámém vzorku. (DEMNEROVÁ K., 2012)

### 7.5.3 Metoda RFLP

Pro rychlý screening potenciálně neinvazivních kmenů *Listeria monocytogenes* je možno využít metodu RFLP neboli polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Tato typizační metoda je dostupná a časově nenáročná. Umožňuje orientační screening potenciálně invazivních kmenů.

Vzorky, které se používají pro metodu RFLP, jsou například vzorky z mléka, sýrů a z pístů od různě velkých nádrží. Tyto vzorky jsou analyzovány podle postupů AOAC, což je Sdružení oficiálních zemědělských chemiků. Vzorky z vody, různých fekálií, potravin a enviromentálního prostředí jsou analyzovány podle metod na přítomnost *Listeria* spp. pomocí selektivního obohacení a izolačních protokolů ministerstva zemědělství. (GELBÍČOVÁ T., 2010)

Tato experimentální část byla prováděna s kmeny, které pocházely ze sbírky Národní referenční laboratoře pro listérie. Při vyšetření bylo použito 151 kmenů *Listeria monocytogenes*, z nichž bylo 38 humánních, 101 potravinových a 12 kmenů, které pocházely z vnějšího prostředí. Před provedením typizace byly kmeny oživeny vyočkováním na krevní agar.

K detekci genů virulence byla použita kombinace čtyř PCR. První detekce *prfA* a *plcA*, druhá detekce *LLO* a *actA*, třetí detekce *plcB* a poslední čtvrtá detekce *InlA*, *InlC*, *InlB* a *InlJ*. Všechny reakce se setkaly s primery syntetizovanými firmou Generi Biotech, z České republiky.

Polymorfismus genu *InlA* byl sledován metodou PCR-RFLP s využitím primerů *seq01* a *seq02*, kdy amplifikovaný produkt *InlA* byl štěpen restrikční endonukleasou *AluI*.

Polymorfismus značí existenci dvou a více variant genů v jednom lokusu. První cyklus trval 4 minuty při 94 °C, následovalo 30 cyklů při 94 °C po dobu 30 sekund, 52 °C po dobu jedné minuty, 72 °C po dobu 2 minut 30 sekund a závěrečný krok při 72 °C po dobu 7 minut. Detekce produktů a fragmentů PCR-RFLP byly separovány elektroforézou v 1,5 – 3,5 % agarovém gelu s následujícím obarvením cel v roztoku ethidiumbromidu a vizualizací pod UV světlem. (ATIL E., 2011)

V tabulce č. 2 jsou popsány dva typy kmene: invazivní a neinvazivní, které mají i různé původy, jsou buď humánní, z potravin nebo z prostředí a nejvíce objevené sérotypy, což jsou 1/2b, 4b, 4d, 1/2a, 1/2c.

Využití PCR-RFLP umožňuje detekci polymorfismu genu internalinu A pro screening kmenů *Listeria monocytogenes* s různou schopností vnikat do epitelálních buněk. Byla prokázána souvislost mezi jednotlivými RFLP profily a sérovými skupinami. U kmenů linie I, do které patří sérotypy 1/2b, 4b a 4d, byl detekován pouze RFLP profil 2. Kmeny *Listeria monocytogenes* linie II, kterým náleží sérotyp 1/2c a 1/2a, patří k RFLP profilům 1, 3, 4 a 5.

Z tabulky lze dále vyčíst, že z celého souboru testovaných kmenů bylo 52,3 % invazivních kmenů s profilem 2 a 3, u kterých byl prokázán funkční internalin A s molekulovou hmotností 80 kDa. RFLP profil 5, který je také spojován s produkcí funkčního internalinu A, byl detekován pouze ojedinele, a to s 6,3 %. Potenciálně patogenní izoláty *Listeria monocytogenes* pocházely i z environmentálních zdrojů.

K RFLP profilům 1 a 4, patřícím mezi potenciálně neinvazivní kmene, je spojována produkce zkrácené formy internalinu A. Mají sníženou schopnost vstupovat do epitelálních buněk tkáňových kultur.

Mezi tyto kmene patřilo 66,7 % kmenů z vnějšího prostředí a 43,6 % potravinových kmenů *Listeria monocytogenes*.

Kmeny s profilem 1 a 4 nemají pouze zkrácené formy internalinu A, mohou také produkovat jeho funkční formu. To znamená, že u 42,1 % humánních kmenů, které byly získány z listeriózy, byly rovněž detekovány právě RFLP profily 1 a 4.

U profilu 4 náleží kmene se sérotypem 1/2a a 1/2c, kdy u sérotypu 1/2c není žádný kmen, nepodílející se na invazivní formě listeriózy u lidí. U kmenů sérotypu 1/2a a 1/2c, u kterých jsou detekovány profily, které jsou spojovány s nižší invazivitou *Listeria monocytogenes*, je k prokázání virulence nutná kombinace metody RFLP s dalšími technikami

nebo její případná optimalizace. Optimalizovat ji lze možným zesílením delšího fragmentu internalinu A, který má vyšší obsah bodových mutací, či použitím dalších restričních endonukleas.

Nositelé mutací, které vedou ke vzniku zkráceného internalinu A, jsou nejčastěji kmeny *Listeria monocytogenes*, pocházející častěji z potravin než od lidí. Na vzniku humánních listerióz se však mohou podílet i kmeny *Listeria monocytogenes* sérotypu 1/2a a 1/2c, s bodovými mutacemi genu internalin A. (GELBÍČOVÁ T., 2011)

Typ kmene	RFLP profil	Genetická linie	Sérotyp	Původ	Počet kmenů
Invazivní	2	I	1/2b	humánní	8
				potraviny	28
				prostředí	0
	2	I	4b	humánní	8
				potraviny	17
				prostředí	2
	2	I	4d	humánní	0
				potraviny	3
				prostředí	0
	3	II	1/2a	humánní	5
potraviny				6	
prostředí				2	
5	II	1/2a	humánní	1	
			potraviny	3	
			prostředí	0	
Potenciálně neinvazivní	1	II	1/2a	humánní	11
				potraviny	11
				prostředí	6
	4	II	1/2a	humánní	5
				potraviny	11
				prostředí	2
	4	II	1/2c	humánní	0
potraviny				22	
				prostředí	0

**Tabulka 2** – Původ testovaných kmenů s uvedením jejich sérotypu a RFLP profilu (GELBÍČOVÁ T., 2011)

#### 7.5.4 Genotypizační metody

Genotypizační metody jsou další z molekulárně biologických metod, které se užívají ke zjištění míry příbuznosti mezi jednotlivými izoláty daného druhu získanými z různých zdrojů a v různém čase. Genotypizační metody mohou být založeny na štěpení DNA restričními endonukleasami, s následným rozšířením získaných fragmentů pomocí PCR, na zvětšení úseků ohraničených repetitivními sekvencemi, pomocí PCR nebo na amplifikaci fragmentů náhodnými primery.



Množina získaných fragmentů je poté analyzována z hlediska jejich přítomnosti či nepřítomnosti u jednotlivých izolátů, kdy míra shody je mírou jejich příbuznosti. Srovnání sekvencí vybraných konzervativních genů využívá metoda MLST (Multi-Locus Sequence Typing). Tato metoda byla použita i při průzkumu listeriózy v Rakousku a na Slovensku. (DEMNEROVÁ K., 2012)

Metody typizování na bázi molekulární biologie se stále častěji používají k detekci zdrojů kontaminace a cest, které ke kontaminaci vedou potravinovým řetězcem pomocí *Listeria monocytogenes*.

Často používanou metodou, s vysokou reprodukovatelností, je makro-restrikční analýza bakteriálního genomu, která je provedena *in situ*, po níž následuje pulzní gelová elektroforéza, ve které se určuje hlavně pulstyp listérií. (WIECZOREK K., 2017)

### **7.5.5 Pulzní gelová elektroforéza - PFGE**

Pulzní gelová elektroforéza je metoda, která umožňuje efektivní dělení dlouhých úseků molekul DNA, které jsou větší než 15 kb. Mohou být velké až několik Mb. Největší molekula DNA byla prozatím o velikosti 10 Mb. K separaci se používá elektrické pole, nebo též změny elektrického proudu během elektroforézy, které periodicky mění směr gelové matrice. V současném období vysoce výkonného sekvenování hraje PFGE důležitou roli v genomové analýze. (WANG C.-X., 2013)

Pulzní gelová elektroforéza se používá na vyšetření molekulární subtypizace mikroorganismů. Nejvíce vyšetřovanou molekulární subtypizací jsou pulstypy. PFGE poskytuje kombinovanou analýzou různé typy makro-restrikčních profilů.

V roce 2017 bylo prováděno vyšetření pulstypů, kde bylo zjištěno, že by pulstypy mohly být seskupeny do 6 různých shluků neboli klastrů, I-IV.

Shluk I zahrnuje 7 pulstypů, které mají 73,6 % podobnost. Tento klaster zahrnoval 12 izolátů *Listeria monocytogenes* s molekulárními sérotypy 1/2a-3a a jeden kmen klasifikovaný jako 1/2c. Z těchto izolátů bylo několik rezistentních vůči antibiotiku ceftriaxonu, klindamycinu nebo oxacilinu.

Klaster II měl podobnost 75,7 % a zahrnoval 14 kmenů, které měly sérotypy 1/2b-3b-7. Z klasteru II byly kmeny rezistentní hlavně k oxacilinu a ceftriaxonu.

Klastr III, s podobností 79,6 %, měl pouze dva kmeny se sérotypem 4b-4d-4e, které byly charakterizovány rezistencí vůči ceftriaxonu, oxacilinu a střední rezistencí vůči klindamycinu.

V klastru IV byly izolovány kmeny 1/2a-3a, s podobností 70,7 % a úzce souvisely s kmeny skupiny V, která se řadí mezi nejpočetnější klastry.

Klastr V, s podobností 84,3 %, se sérotypem 1/2a-3a, vykazoval rezistenci na oxacilin. Tento shluk byl izolován z různých druhů ryb.

Poslední skupinou kmenů je klastr VI, který měl podobnost pouhých 64,4 % a zahrnoval pouze 3 kmeny se sérotypem 1/2a-3a. Poslední klastr byl izolován z uzeného lososa a čerstvého pstruha.

Separace probíhá na základě rozdílných velikostí molekul. Kratší molekuly gelem putují výrazně rychleji, kdežto molekuly o dlouhém úseku DNA putují gelem pomaleji. (WIECZOREK K., 2017)

## 8 ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala rodu *Listeria* a jeho novému taxonomickému rozdělení. Objasnila jsem historii listérií, rozdělení, patogenitu, výskyt listérií v České republice a v okolních státech. Nakonec jsem se zaměřila na metody používané pro jejich identifikaci.

Listérie jsou gram-pozitivní tyčinkovité, anaerobní bakterie. I když nepatří mezi mikroorganismy, které tvoří spory, patří mezi mikroorganismy, které tvoří biofilmy. Právě díky biofilmům se nacházejí na různých místech, nejčastěji na strojích potravinářského průmyslu, kde přežijí i několik let. Do tohoto rodu patří pouze dvě listérie, které jsou patogenní pro člověka a pro zvířata. *Listeria monocytogenes*, která může způsobit septikémii, gastroenteritidu, infekci centrální nervové soustavy, ale i samovolné potraty nebo postižení plodu. Druhá patogenní listérie je *Listeria ivanovii*, která je spíše patogenní pro zvířata. Jsou ale i případy, kdy se objevila u lidí.

Rod *Listeria* zahrnuje v současné době 17 uznaných druhů a jeden druh listérie, který není plně probádaný. Byla objevena v nedávné době a první publikace o této nové listérii, která se nazývá *Listeria constaricensis*, se objevily teprve v roce 2018. Listérie se dále rozdělily do dvou skupin. Rozdělení proběhlo pomocí společných genotypových a fenotypových vlastností každého druhu. Tyto skupiny se nazývají *Listeria sensu stricto* a *Listeria sensu lato*.

*Listeria sensu stricto* je starší skupinou, do které patří 6 druhů. Právě v této skupině jsou jediné dvě patogenní listérie. Všechny listérie, kromě jedné, náležící do této skupiny byly popsány před rokem 1985. Jediná *Listeria marthii* byla popsána roku 2010, a tudíž je zařazena mezi nejnověji nalezené listérie, ve skupině *Listeria sensu stricto*, za posledních deset let.

*Listeria sensu lato* je novější skupinou. Patří sem 13 nových druhů, včetně *Listeria constaricensis*. Tato skupina se dělí na tři rody - *Murraya*, *Mesolisteria* a *Paenilisteria*. Celá skupina *Listeria sensu lato* není patogenní, pohyblivá, kromě jediné pohyblivé listérie, kterou je *Listeria grayi*. Všechny druhy jsou schopné redukovat dusičnany na dusitany, kromě *Listeria floridensis*.

K nejčastějšímu prokázání nových druhů listérií na selektivních chromogenních agarech slouží OXFORD agar, na kterém se nové druhy listérií očkují. Jelikož *sensu lato* netvoří hemolýzu je krevní agar pro průkaz zbytečný. Nové druhy listérií se prokázaly fylogenetickou analýzou, která se provádí molekulárně biologickými metodami. Molekulárně biologické metody využívají znalosti genomu mikroorganismů, což je důležitý bod pro detekci

mikroorganismů a rozřazení do náležitých skupin. Nejčastěji používané molekulárně biologické metody jsou PCR metoda, Real-time PCR a genotypizační metoda. Díky molekulárně biologickým metodám byl zjištěn genom jednotlivých druhů nových listérií, které se dále mohly přiřadit do skupin.

V budoucnu by bylo možné rozdělení listérií díky průkazu fylogenetické analýzy, která přiřazuje různé podobnosti genových sekvencí k již objeveným druhům listérií. Fylogenetická analýza u rodu *Listeria* je založená na 16S rRNA, u které se zjišťuje nejvyšší sekvenční podobnost s již identifikovaným a zařazeným druhem. Mezi další důležité průkazy náleží celková genomová sekvenční analýza a biochemické testy.

Jelikož nově nalezené druhy listérií mají vždy podobnost k nějakému již známému druhu, předpokládám, že v budoucnu by se mohly objevit i další nové druhy. Bylo zjištěno, že nepatogenní druhy se vyvinuly z patogenních druhů ztrátou genu pro patogenitu. Jsem přesvědčena o tom, že při dalších ztrátách různých genů nebo dalších letálních přenosech genů z jiných mikroorganismů může vzniknout další druh listérie.

## 9 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] ALLEN, Kevin J., Ewa WALECKA-ZACHARSKA, Jessica C. CHEN, et al. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiology*. 2016, **54**, 178-189.
- [2] ATIL, E., HB ERTAS a G. OZBEY. Isolation and molecular characterization of *Listeria* spp. from animals, food and environmental samples. *Veterinární Medicína*. 2011, **56** (8), 386-394.
- [3] BELL, C. a Alec. KYRIAKIDES. *Listeria: a practical approach to the organism and its control in foods*. New York: Blackie Academic & Professional, 1998. ISBN 0-7514-0464-0.
- [4] BERTSCH, David, Jörg RAU, Marcel R. EUGSTER, et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013, **63**, 526-532.
- [5] BĒRZIŅŠ, Aivars, Margarita TERENTJEVA a Hannu KORKEALA. Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* in Vacuum-Packaged Ready-to-Eat Meat Products at Retail Markets in Latvia. *Journal of Food Protection*. 2009, **72**(6), 1283-1287.
- [6] BLAŽKOVÁ Martina, L. KARAMONOVÁ, L. FUKAL a P. RAUCH. *Listeria monocytogenes* – NEBEZPEČNÝ PATOGEN A JEHO DETEKCE V POTRAVINÁCH. *Chemické listy*. 2005, **99**, 467-473.
- [7] BRYCHTA J., BULAWOVÁ H., KLÍMOVÁ E. Frekvence výskytu *Listeria monocytogenes* v potravinách. *Veterinářství*. 2011, **61**, 458-461.
- [8] BUCHRIESER, C., C. RUSNIOK, P. GARRIDO, et al. Complete Genome Sequence of the Animal Pathogen *Listeria ivanovii*, Which Provides Insights into Host Specificities and Evolution of the Genus *Listeria*. *Journal of Bacteriology*. 2011, **193** (23), 6787-6788.
- [9] CHAIRA, Matteo, Marta CARUSO, Anna M. D'ERCHIA, et al. Comparative Genomics of *Listeria* Sensu Lato: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Genome biology and evolution*. 2015, **7**(8), 2154-7172.
- [10] ČSN EN ISO 11290-2 (560093). *Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Listeria monocytogenes a Listeria spp.* - Část 2:

- Metoda stanovení počtu*. Praha. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. 2017, 44 s., Třídící znak 56 0093
- [11] **ČSN EN ISO 11290-2 (560093)**. *Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Listeria monocytogenes - Část 1: Metoda průkazu*. Praha. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. 1999, 28 s., Třídící znak 56 0093
- [12] **DE LAS HERAS, Aitor, Robert J CAIN, Magdalena K BIELECKA a José A VÁZQUEZ-BOLAND**. Regulation of Listeria virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*. 2011, **14** (2), 118-127.
- [13] **DEMNEROVÁ Kateřina**. Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické listy*. 2011, **106**, 920-925.
- [14] **DEN BAKKER, H. C., B. N. BUNDRANT, E. D. FORTES, R. H. ORSI a M. WIEDMANN**. A Population Genetics-Based and Phylogenetic Approach to Understanding the Evolution of Virulence in the Genus Listeria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, **76** (18), 6085-6100.
- [15] **DEN BAKKER, H. C., C. S. MANUEL, E. D. FORTES, M. WIEDMANN a K. K. NIGHTINGALE**. Genome sequencing identifies Listeria fleischmannii subsp. coloradonensis subsp. nov., isolated from a ranch. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2013, **63** (9), 3257-3268.
- [16] **DEN BAKKER, H. C., S. WARCHOCKI, E. M. WRIGHT, et al.** Listeria floridensis sp. nov., Listeria aquatica sp. nov., Listeria cornellensis sp. nov., Listeria riparia sp. nov. and Listeria grandensis sp. nov., from agricultural and natural environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014, **64**(6), 1882-1889.
- [17] **DIAMEDICA**. ALOA - TERPIŲ LINIJA. [online]. 2018 [cit. 2018-06-04]. Dostupné z: <http://diamedica.lt/lt/aloa-terpiu-linija>
- [18] **DREVETS, Douglas A. a Michael S. BRONZE**. Listeria monocytogenes: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008, **53**(2), 151-165.
- [19] **E & O LABORATORIES LTD**. PP0630 Listeria (Oxford) Agar. *EO Labs*. [online]. 2018 [cit. 2018-06-01]. Dostupné z: [www.eolabs.com/product/pp0630-listeria-oxford-agar/](http://www.eolabs.com/product/pp0630-listeria-oxford-agar/)

- [20] **E & O LABORATORIES LTD.** PP0005 PALCAM Agar. *EO Labs*. [online]. 2018 [cit. 2018-06-01]. Dostupné z: [www.eolabs.com/product/pp0005-palcam-agar/](http://www.eolabs.com/product/pp0005-palcam-agar/)
- [21] **GELBÍČOVÁ, Tereza a Renata KARPÍŠKOVÁ.** Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food from retail market in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, **27** (2), S2-3-S2-7.
- [22] **GELBÍČOVÁ, Tereza a Renata KARPÍŠKOVÁ.** Outdoor environment as a source of *Listeria monocytogenes* in food chain. *Czech Journal of Food Sciences*. 2012, **30**(1), 83-88.
- [23] **GELBÍČOVÁ, Tereza a Renata KARPÍŠKOVÁ.** Patogenní potenciál *L. monocytogenes* izolovaných z potravin. *Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí*. 2010, 38-40.
- [24] **GELBÍČOVÁ, Tereza a Renata KARPÍŠKOVÁ.** Využití metody PCR-RFLP k detekci potenciálně invazivních kmenů *L. monocytogenes*. *Chemické listy*. 2011, **105**(9), 702-706.
- [25] **GUILBAUD, Morgan, Pascal PIVETEAU, Miskael DESVAUX, et al.** Exploring the Diversity of *Listeria monocytogenes* Biofilm Architecture by High-Throughput Confocal Laser Scanning Microscopy and the Predominance of the Honeycomb-Like Morphotype. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, **81**(5), 1813-1819
- [26] **GUILLET, Christelle, Olivier JOIN-LAMBERT, Alban LE MONNIER, et al.** Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*. 2010, **16**(1), 136-138.
- [27] **HALLSTROM, Kelly N. a Beth A. MCCORMICK.** Pathogenicity Islands. *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, 2015, 303-314.
- [28] **HERNANDEZ-MILIAN, Almudena a Antoni PAYERAS-CIFRE.** What Is New in Listeriosis?. *BioMed Research International*. 2014, 1-7.
- [29] **HIMEDIA Laboratories.** *Listeria* Identification Agar Base (PALCAM). *Technical Data*. [online]. 2015 [cit. 2018-06-03]. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/M1064.pdf>
- [30] **HITCHINS, Anthony D., Karen JINNEMAN, Yi CHEN.** Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental amples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. *BAM: Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes*. U.S. FOOD & DRUG. 2017, **10**.

- [31] **CHIARA, Matteo, Marta CARUSO, Anna Maria D'ERCHIA, et al.** Comparative Genomics of *Listeria Sensu Lato*: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Genome Biology and Evolution*. 2015, **7**(8), 2154-2172.
- [32] **CHIJOKE, Nsofor A.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): Principles and Applications in Molecular Epidemiology: A Review. *International Journal of Current Research in Medical Sciences*. 2016, **2**(2), 38-51.
- [33] **JANČOVÁ, Jana a Tereza ŠKAPOVÁ.** *Listeria monocytogenes*- Původce listeriózy. *Zpravodaj Centra MPI: Oddělení bakteriologie ZÚ Ostrava*. 2007, **3**, 2-7.
- [34] **KLEIN, Natalie C., Paul E. SCHOCH a Burke A. CUNHA.** *Listeria*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1991, **12**(5), 311-314.
- [35] **KOCOT, Aleksandra M. a Magdalena A. OLSZEWSKA.** Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *LWT – Food Science and Technology. Elsevier*. 2017, **84**, 47-57.
- [36] **KREFT, Jürgen a José A. VÁZQUEZ-BOLAND.** Regulation of virulence genes in *Listeria*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2001, **291**(2), 145-157.
- [37] **MEDINI, Duccio, Claudio DONATI, Hervé TETTELIN, Vega MASIGNANI a Rino RAPPUOLI.** The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2005, **15**(6), 589-594.
- [38] **NÚÑEZ-MONTERO, Kattia, Alexandre LECLERCQ, Alexandra MOURS, et al.** *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018, **68**, 844-850.
- [39] **ORSI, Renato H. a Martin WIEDMANN.** Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**(12), 5273-5287.
- [40] **PIZARRO-CERDA, J., A. KUHbacher a P. COSSART.** Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, **2**(11), a010009-a010009.
- [41] **PORTNOY, Daniel A., Victoria AUERBUCH a Ian J. GLOMSKI.** The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Cell Biology*. 2002, **158**(3), 409-414.



- [42] **RAMASWAMY, V., V. M. CRESENCE, J. S. REJITHA, M. U. LEKSHMI, et al.** Listeria – review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2007, **40**(1), 4- 13.
- [43] **RUPPITSCH, Werner, Rita PRAGER, Sven HALBEDEL et al.** Ongoing outbreak of invasive listeriosis, Germany, 2012 to 2015. *Eurosurveillance*. 2015, **20**(50).
- [44] **RYSER, Elliot T. a Elmer H. MARTH.** *Listeria, listeriosis, and food safety*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c1999. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), **92**. ISBN 0-8247-0235-2.
- [45] **SAUDERS, Brian D., Jon OVERDEVEST, Esther FORTES, et al.** Diversity of Listeria Species in Urban and Natural Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, **78**(12), 4420-4433.
- [46] **SCALLAN, Elaine, Robert M. HOEKSTRA, Frederick J. ANGULO, et al.** Foodborne illness Acquired in the United States-Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 2011, **17**(1), 7-15
- [47] **SCHARDT, Jakob, Grant JONES, Stefanie MÜLLER-HERBST, et al.** Comparison between Listeria sensu stricto and Listeria sensu lato strains identifies novel determinants involved in infection. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 1-14.
- [48] **SCHMID, D., F. ALLERBERG, S. HUHULESCU, A. PIETZKA, et al.** Whole genome sequencing as a tool to investigate a cluster of seven cases of listeriosis in Austria and Germany. *Bacteriology*. 2014, **20**(5), 431-436.
- [49] **SUCHODOLSKI, Jan S.** Gastrointestinal Microbiota. *Canine and Feline Gastroenterology*. Elsevier, 2013, 32-41.
- [50] **ŠILHOVÁ-HRUŠKOVÁ, Lenka, Petra MOŤKOVÁ, David ŠILHA a Jarmila VYTRÁSOVÁ.** Hodnocení tvorby biofilmu vybraných patogenů vyskytujících se v potravinářském průmyslu. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: časopis Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti J.E. Purkyně*. *ResearchGate*. 2015, **64**(3), 169-174
- [51] **VEGA, Yolanda, Markus RAUCH, Mark J. BANFIELD, Svetlana ERMOLAEVA, Mariela SCORTTI, Werner GOEBEL a José A. VÁZQUEZ-BOLAND.** New Listeria monocytogenes prfA\* mutants, transcriptional properties of PrfA\* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Molecular Microbiology*. 2004, **52**(6), 1553-1565.

- [52] **VÉGHOVÁ, Adriana, Janka Koreňová, Jana MINAROVÍČOVÁ, et al.** Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the environment of three ewes' milk processing factories in Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2015, **54**(3), 252-259.
- [53] **WANG, C.-X. a S.-L. LIU.** Pulsed-field Gel Electrophoresis. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, 2013, 529-531.
- [54] **WELLER, D., A. ANDRUS, M. WIEDMANN a H. C. DEN BAKKER.** *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2015, **65**(1), 286-292.
- [55] **WIECZOREK, Kinga a Jacek OSEK.** Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiology*. 2017, **64**, 164-171.